



Hinc patiam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**



## **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MICROCÁPSULAS DE INULINA DE DIFERENTES GRAUS DE POLIMERIZAÇÃO MÉDIO PRODUZIDAS POR *SPRAY DRYING***

**Ana Inês Mateus de Carvalho**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em **Engenharia  
Alimentar**

**Orientador:** Professora Doutora Maria Isabel Nunes Januário

**Co-Orientador:** Doutora Sara Beirão da Costa

**Júri:**

**PRESIDENTE:** Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

**VOGAIS:** - Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, Professora Catedrática Aposentada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Maria Isabel Nunes Januário, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Sara Maria Martins Beirão da Costa Teixeira de Barros, Professora Auxiliar Convidada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor António Eduardo Baptista Leitão, Investigador Auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical.

Lisboa, 2013

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho só foi possível graças ao apoio, empenho e dedicação de muitas pessoas às quais não posso deixar de agradecer:

À Professora Doutora Eng.<sup>a</sup> Maria Isabel Januário, minha orientadora, por ter aceitado orientar-me, pelo seu apoio, atenção, dedicação, disponibilidade, empenho, paciência, amabilidade e amizade incondicionais que foram fundamentais no decorrer deste trabalho.

À Doutora Eng.<sup>a</sup> Sara Beirão da Costa, minha co-orientadora, pelo apoio e disponibilidade a mim dedicados.

Ao Eng. Eduardo Leitão e às técnicas Isabel Pais e Elisabete Tiago por todo o apoio e disponibilidade na utilização do HPLC.

Ao Sr. Octávio Chaveiro pelo apoio e disponibilidade na execução do SEM.

Ao pessoal do laboratório de fisiologia pelo apoio e disponibilidade na realização da liofilização.

Ao Eng. Joaquim Neves da Eurosalmo e à Dr<sup>a</sup> Eszter Heijnen (Sensus) pelos esclarecimentos prestados e pela oferta da amostra Frutalose OFP utilizada neste trabalho.

Aos meus amigos e colegas que me acompanharam ao longo do meu percurso no ISA, não esquecendo de agradecer aos colegas que trabalharam comigo no decorrer deste trabalho e que me ajudaram a não desanimar.

À minha família pelo apoio, dedicação, amor e carinho incondicionais, que permitiram que tudo isto fosse possível. Em particular, gostaria de dedicar este trabalho ao meu avô.

Ao Luís, o meu namorado, pelo apoio, compreensão, força e amor constantes, imprescindíveis em todo o meu percurso.

A todos o meu Muito Obrigada!

## RESUMO

A inulina assume um papel importante na indústria alimentar, sendo incorporada em diversos alimentos, combinando propriedades funcionais enquanto prebiótico e fibra alimentar, e propriedades tecnológicas, nomeadamente, como substituto de açúcar ou de gordura. Enquanto matriz de encapsulamento, a inulina permite, ainda, veicular substâncias activas, protegendo-as de condições desfavoráveis.

Este trabalho teve como objectivo principal estudar o efeito do grau de polimerização (GP) da inulina na morfologia das microcápsulas formadas por *Spray Drying*. Foi efectuada a determinação do grau de polimerização médio ( $GP_m$ ) por HPLC e, também, avaliados os efeitos da temperatura de atomização (120 e 190 °C) e do teor de sólidos (5, 10 e 15%).

As microcápsulas apresentaram dimensões médias entre 20 e 32  $\mu m$  para um  $GP_m$  de 4 (FOS), e entre 3 e 10  $\mu m$  para as inulinas de  $GP > 10$  e com  $GP_m$  a variar entre 26 e 35. Os FOS formaram microcápsulas alongadas de superfície lisa e contorno irregular com maior heterogeneidade de tamanhos. As microcápsulas da inulina de maior GP apresentaram-se maioritariamente esféricas com superfície lisa, sobretudo quando atomizadas a 190 °C. Os efeitos da temperatura de secagem e da concentração de sólidos mostraram-se dependentes do GP da inulina.

**Palavras-chave:** FOS, inulina, microencapsulamento,  $GP_m$ , HPLC, *Spray Drying*.

## ABSTRACT

Inulin plays an important role in food industry, being incorporated in different products because it combines prebiotic and functional properties as dietary fiber and technological properties, in particular as substitute for sugar or fat. While encapsulation matrix, inulin also allows to carry active substances, protecting them from adverse conditions.

The main objective of this study was to evaluate the effect of inulin degree of polymerization (DP) on the morphology of microcapsules formed by Spray Drying, with the determination of the average degree of polymerization ( $DP_a$ ) performed by HPLC. The effects of atomization temperature (120 and 190 °C) and of solids concentration (5, 10 and 15%) were also evaluated.

The microcapsules showed a mean size between 20 and 32  $\mu\text{m}$  for  $DP_a$  of 4 (FOS), and between 3 and 10  $\mu\text{m}$  for inulin with  $DP > 10$  and  $DP_a$  ranging between 26 and 35. The FOS originate elongated microcapsules with smooth surface and irregular shape, demonstrating greater size heterogeneity. By contrast, the microcapsules of inulin with higher DP are mainly spherical with smooth surface, especially when atomized at 190 °C. The effects of drying temperature and of solids concentration were dependent on inulin DP.

**Keywords:** FOS, inulin, encapsulation,  $DP_a$ , HPLC, *Spray Drying*.

## EXTENDED ABSTRACT

Part of dietary fiber, particularly soluble fiber, are prebiotics. The different definitions of this concept have in common two things: the component is not digestible (i.e., be resistant to the enzymatic activity of human digestive system) and having the ability to selectively stimulate the growth of desirable colon beneficial bacteria, contributing to health and well-being.

Thus the prebiotics are widely used in the food and pharmaceutical industries as functional ingredients being incorporated into products such as beverages, yogurts and biscuits, and / or used as nutritional supplements.

The application of microencapsulation in food industry have increased since the active substances can be carry with protection from extreme conditions, therefore increasing its stability and maintaining its integrity and viability of the final product.

In this context is important to emphasize the inulin as prebiotic ingredient providing a unique combination of properties when is used as encapsulating matrix. This functional substance presents also the huge advantage of not compromising the taste and texture of foods in which it is incorporated, while enabling an protected delivery of compounds with nutritional or other interest.

It is known that the phenomenon of release the core material depends from different factors such as the morphological structure of the system or the type of wall material and the physicochemical characteristics of the encapsulated compound. The presented work is intended to contribute to a better knowledge of inulin as encapsulating matrix.

In this study the morphological characteristics of inulin were evaluated taking into account the influence of the following factors:  $DP_a$  (average degree of polymerization) of inulin molecule, atomization temperature used in the formation of microcapsules and solids concentration of the inulin solution.

The present study involves a theoretical component that reflects the state of research on this subject and a practical component developed in the laboratory. The experimental assays performed include the extraction and purification of inulin from chicory (native inulin), the characterization of native and commercial samples of inulin by HPLC, the producing of microcapsules by Spray Drying and its characterization by SEM.

As result, the microcapsules showed a mean size between 20 and 32  $\mu\text{m}$  for  $DP_a$  of 4 (FOS), and between 3 and 10  $\mu\text{m}$  for inulin with  $DP > 10$  and  $DP_a$  ranging between 26 and 35. The FOS originate elongated microcapsules with smooth surface and irregular shape, demonstrating greater size heterogeneity. By contrast, the microcapsules of inulin with higher

DP are mainly spherical with smooth surface, especially when atomized at 190 ° C. The effects of drying temperature and of solids concentration were dependent on inulin DP.

The atomization temperature showed have effect on the average diameters of the microcapsules. This effect was directly proportional for FOS and inversely proportional for inulin with high DP, with exception of inulin with higher  $DP_a$  (35) for which this effect failed.

The solids also influenced the diameter of the microcapsules, with a direct proportionality for solids concentrations between 5 and 10%, independently of the DP. For solid content higher than 10%, this effect was directly proportional for the higher DP ( $DP_a=35$ ), stabilized for an intermediate DP ( $DP_a=26$ ) and was inversely proportional for the FOS ( $DP_a=4$ ).

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
EXTENDED ABSTRACT .....	v
LISTA DE QUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
INTRODUÇÃO .....	1
I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
1. Inulina.....	2
1.1. Caracterização e estrutura.....	2
1.2. Propriedades funcionais/fisiológicas .....	3
1.3. Propriedades tecnológicas e aplicações alimentares .....	3
1.4. Fontes de inulina e FOS .....	4
1.5. Obtenção industrial da inulina.....	5
2. Métodos laboratoriais de obtenção e caracterização da inulina .....	6
2.1. Extracção aquosa da inulina das raízes de chicória.....	6
2.2. Separação e Purificação da inulina.....	7
2.3. Obtenção de inulina em pó .....	9
2.4. Determinação do Grau de Polimerização da Inulina .....	10
3. Microencapsulamento em produtos alimentares .....	12
3.1. Produção de microcápsulas.....	14
3.2. Características das microcápsulas .....	19
II – PARTE EXPERIMENTAL.....	21
4. Material e Métodos .....	21
4.1. Material.....	21
4.2. Extracção, Separação e Purificação da inulina no laboratório .....	21
4.3. Determinação do Grau de Polimerização Médio da inulina .....	22
4.4. Produção das microcápsulas de inulina.....	23
4.5. Caracterização das microcápsulas de inulina .....	25
4.6. Análise estatística dos resultados.....	25
5. Resultados e discussão .....	26
5.1. Separação e purificação da fracção de maior GP da inulina nativa do extracto ..	26

5.2.	Determinação do Grau de Polimerização Médio da inulina das amostras.....	27
5.3.	Caracterização das microcápsulas de inulina por SEM.....	28
5.3.1.	Efeito do $GP_m$ e da temperatura de atomização .....	28
5.3.2.	Efeito do Teor de Sólidos .....	36
III –	CONCLUSÕES .....	43
IV –	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
V –	ANEXOS.....	48



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diferentes definições de Grau de Polimerização .....	2
Quadro 2 - Conteúdo em inulina de diferentes fontes vegetais.....	5
Quadro 3 - Amostras utilizadas nos ensaios realizados e suas especificações .....	21
Quadro 4 – Condições dos ensaios de atomização das amostras de inulina.....	24
Quadro 5 - Imagens, obtidas por SEM, das diferentes amostras de inulina (10% de teor de sólidos) atomizadas a 120 e 190 °C .....	28
Quadro 6 - Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das microcápsulas das amostras de inulina atomizadas a 120 e 190°C, para 10% de teor de sólidos .....	31
Quadro 7 - Distribuição de frequências das diferentes amostras de inulina (10% de teor de sólidos) atomizadas a 120 e 190 °C .....	33
Quadro 9 - Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das microcápsulas das amostras de inulina atomizadas a 190 °C, para diferentes teores de sólidos.....	36
Quadro 8 - Imagens obtidas por SEM das amostras Frutalose OFP, Inulina Padrão e Inulina Nativa Purificada atomizadas a 190 °C e com diferentes teores de sólidos (5, 10 e 15%)....	37
Quadro 10 - Distribuição de frequências das amostras Frutalose OFP, Inulina Padrão e Inulina Nativa Purificada atomizadas a 190 °C e com diferentes teores de sólidos (5, 10 e 15%).....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da inulina ( $GF_n$ e $F_n$ ) .....	3
Figura 2 - Esquema do tipo de atomizador utilizado nos ensaios realizados .....	16
Figura 3 - Distinção entre microcápsula e microesfera .....	19
Figura 4 - Diferentes tipos de partículas. (A): Matriz (microesfera); (B): Microcápsula simples; (C): Microcápsula simples irregular; (D): Microcápsula com duas paredes; (E): Microcápsula com vários núcleos; (F): Agrupamento de microcápsulas.....	20
Figura 5 - Equipamento de HPLC utilizado nas análises realizadas (A), Coluna Sugar-Pak I utilizada no doseamento de açúcares (B), Injector e controlador de temperatura da coluna (C).....	23
Figura 6 - Atomizador utilizado nos ensaios realizados (D), Câmara de secagem do atomizador (E), Recolha através do ciclone da amostra atomizada (F) .....	25
Figura 7 – Registos cromatográficos obtidos por HPLC do Extracto (1) e da Inulina Nativa Purificada (2).....	26
Figura 8 - Graus de polimerização médio determinado por HPLC para as amostras de inulina .....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – Análise de variância
- $DP_a$  – average Degree of Polymerization
- F – Molécula de frutose
- $Fi$  – Frutose proveniente da hidrólise de inulina
- FOS – Frutooligossacáridos ou oligofrutose
- G – Molécula de glucose
- GF – Molécula de sacarose
- $GF_n$  ou  $F_n$  – Estrutura química das frutanas, onde  $n$  representa o número de moléculas de frutose (F), e (G) a molécula terminal de glucose ( $n \geq 2$ )
  - $Gi$  – Glucose proveniente da hidrólise da inulina
  - GLC – Cromatografia gás-líquido
  - GP – Grau de Polimerização
  - $GP_m$  – Grau de Polimerização médio
  - HPAEC-PAD – Cromatografia de troca aniônica com detecção amperométrica (*High-performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector*)
    - HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*)
  - Rpm – Rotações por minuto
  - SEM – Microscópio Electrónico de Varrimento (*Scanning Electron Microscope*)

## INTRODUÇÃO

Parte das fibras alimentares, nomeadamente das fibras solúveis, são prebióticos. As diferentes definições deste conceito têm em comum dois aspectos: o composto não ser digerível (isto é, ser resistente à actividade enzimática do aparelho digestivo humano) e ter a capacidade de estimular selectivamente o crescimento desejável de bactérias benéficas do cólon, contribuindo para a saúde e bem-estar.

Assim, os prebióticos são muito usados na indústria alimentar como ingrediente funcional, sendo incorporados em produtos como bebidas, iogurtes e biscoitos, e/ou utilizados como suplementos alimentares.

Por outro lado, as aplicações de microencapsulamento na indústria alimentar têm vindo a aumentar, uma vez que deste modo as substâncias activas a veicular são protegidas de condições desfavoráveis, aumentando a sua estabilidade e mantendo a sua integridade e viabilidade no produto final.

Neste contexto sobressai a importância da inulina enquanto ingrediente alimentar prebiótico, oferecendo uma combinação única de propriedades quando utilizada como matriz encapsulante. Esta substância funcional apresenta, ainda, a enorme vantagem de não comprometer o sabor e textura dos alimentos no qual é incorporada, enquanto permite a “entrega” protegida de compostos com interesse nutricional ou de outro tipo.

Sabe-se que o fenómeno de libertação do material encapsulado depende de factores como a estrutura morfológica do sistema, o tipo de material de parede e as características físico-químicas do composto encapsulado. Com o trabalho aqui apresentado pretende-se contribuir para o melhor conhecimento da inulina enquanto matriz encapsulante.

Desta forma, na tentativa de esclarecer o efeito do grau de polimerização médio ( $GP_m$ ) desta substância nas suas características encapsulantes, e no seguimento de trabalhos anteriores, utilizaram-se diferentes amostras de inulina cujo  $GP_m$  foi determinado. Avaliou-se a influência deste parâmetro, bem como os efeitos da temperatura de atomização e do teor de sólidos, na morfologia das microcápsulas.

Neste sentido, o presente trabalho envolve uma componente teórica que reflecte a pesquisa bibliográfica realizada acerca do tema, e uma componente prática desenvolvida em laboratório. Os ensaios experimentais realizados incluíram a obtenção e purificação da inulina nativa da chicória, a caracterização por HPLC da inulina das amostras, a produção de microcápsulas por atomização e sua caracterização por microscopia electrónica de varrimento (SEM).

## I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Inulina

#### 1.1. Caracterização e estrutura

A inulina, isolada pela primeira vez em 1804 pelo cientista alemão Rose, constitui um polissacárido de reserva pertencente à família das frutanas. As frutanas são polímeros de frutose, lineares ou ramificados, possuindo em geral uma ligação terminal frutose-glucose (sacarose) (Kelly, 2008). Nas dicotiledóneas, as frutanas encontram-se sob a forma de inulina de cadeia linear com ligações glicosídicas do tipo  $\beta(2\rightarrow1)$  entre as unidades de frutose. Nas monocotiledóneas, as frutanas apresentam ligações do mesmo tipo e, também, ramificações do tipo  $\beta(2\rightarrow6)$  entre as unidades de frutose, sendo estes polímeros designados por levanas (Januário, 1999; Simão, 2004; Madrigal e Sangronis, 2007; Barreiros, 2009).

Outra forma de descrever estes compostos está associada ao seu grau de polimerização, em relação ao qual podem considerar-se os conceitos expressos no quadro 1.

**Quadro 1 - Diferentes definições de Grau de Polimerização**

<b>Termo</b>	<b>Definição</b>
<b>Grau de Polimerização (GP)</b>	Número de unidades de repetição numa cadeia de um oligómero ou polímero.
<b>Grau de Polimerização Médio (GP<sub>m</sub>)</b>	Utilizado para descrever misturas com diferentes valores de grau de polimerização.
<b>Grau de Polimerização Máximo (GP<sub>max</sub>)</b>	Representa a cadeia mais longa de uma mistura.

Fonte: Kelly, 2009.

Incluídos na designação genérica de inulina podem distinguir-se dois grupos de compostos de acordo com o seu GP: os frutooligossacáridos (FOS) ou oligofrutose e a inulina propriamente dita (GP>10). Os FOS são oligómeros de frutose, em geral com uma unidade terminal de glucose, variando o GP entre 3 e 10. A inulina propriamente dita consiste num conjunto de polímeros, cujo GP pode variar entre 10 e 60 unidades de frutose unidas por ligações  $\beta(2,1)$ -frutofuranosídicas, sendo-lhe atribuído um GP<sub>m</sub> de 25 (Franck, 2002; Roberfroid, 2007).

O  $GP_m$  da inulina varia de acordo com a fonte vegetal, sofrendo alterações ao longo do período de colheita, e com o tempo de espera da matéria-prima até processamento (Januário, 1999; Oliveira *et al.*, 2004; Roberfroid, 2007).

A estrutura química molecular da inulina é predominantemente do tipo  $GF_n$ , podendo apresentar também compostos do tipo  $F_n$ , correspondendo  $G$  à glucose,  $F$  à frutose e  $n$  ao número de unidades de frutose presentes, como indica a figura 1.

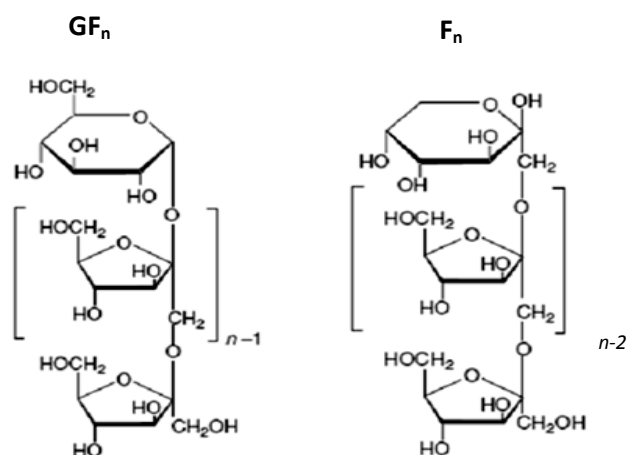


Figura 1 - Estrutura química da inulina ( $GF_n$  e  $F_n$ )

Fonte: adaptado de Franck, 2006.

## 1.2. Propriedades funcionais/fisiológicas

A inulina é utilizada como ingrediente alimentar funcional combinando propriedades nutricionais e funcionais interessantes, nomeadamente, como fibra alimentar e prebiótico (Januário, 1999 e 2011; Oliveira *et al.*, 2004; Simão, 2004; Barreiros, 2009).

O facto de esta frutana apresentar resistência à digestão enzimática no tracto gastrointestinal superior, atingindo o cólon praticamente intacta e só aqui sofrer fermentação bacteriana, permite-lhe funcionar quer como veículo protector de outros constituintes, quer como promotor do crescimento de bactérias benéficas da microbiota (Toneli *et al.*, 2008a; Kelly, 2009).

A inulina apresenta, ainda, benefícios a nível das funções imunitárias, do metabolismo dos lípidos e da biodisponibilidade de minerais, nomeadamente, a nível do cálcio, magnésio e ferro (Roberfroid, 2002; Madrigal e Sangronis, 2007).

## 1.3. Propriedades tecnológicas e aplicações alimentares

Os FOS e a inulina são considerados fibras solúveis, não comprometendo as características intrínsecas do produto (sabor e textura), pelo que estas frutanas permitem a

formulação de produtos ricos em fibra com aspecto e sabor semelhantes aos produtos *standard* (Franck, 2002; Kelly, 2009).

A importância da inulina na indústria alimentar prende-se, por outro lado, com as suas propriedades tecnológicas dependentes do seu GP. Pode actuar, nomeadamente, como substituto de açúcar e/ou de gordura, gelificante, espessante, estabilizante de espumas e emulsões, agente de textura e material encapsulante.

Como substituto de açúcar deve utilizar-se a fracção da inulina de cadeia mais curta, ou seja, os FOS. Este tipo de inulina é mais solúvel que a sacarose, apresentando qualidades semelhantes ao açúcar ou xarope de glucose e cerca de 30 a 50% do poder adoçante do açúcar de mesa. Assim, não apresentando poder adoçante suficiente, os FOS são combinados com edulcorantes de modo a obter-se um aumento deste efeito (Franck, 2002; Kelly, 2009).

Já a inulina utilizada como substituto de gordura é a de cadeia mais longa e elevada massa molecular, ou seja, a de maior GP. Este tipo de inulina apresenta menor solubilidade e, quando misturada na forma de gel, com água ou leite, aumenta a estabilidade de espumas e emulsões, permitindo uma textura cremosa e sensação suave e macia na boca, características da gordura. Assim, esta inulina pode ser incorporada em alimentos como lacticínios ou cremes de barrar (Franck, 2002; Kelly, 2009).

Embora esta frutana possa ser utilizada numa vasta gama de produtos alimentares, não é no entanto adequada para integrar refrigerantes ou compotas de frutas, uma vez que o baixo valor de pH destes alimentos provoca a sua hidrólise em monossacáridos (Kelly, 2009).

Devido à sua capacidade de actuar como substituto de açúcar e/ou de gordura, dependendo do seu GP, a inulina é utilizada na produção de alimentos com reduzido valor calórico, tais como os produtos *light* e *diet* (Toneli *et al.*, 2008b).

Por outro lado, sem contribuição calórica durante o processo digestivo, tendo um efeito fisiológico correspondente às fibras dietéticas, a inulina é utilizada como um ingrediente funcional e, ainda, como suplemento dietético (Toneli *et al.*, 2008b; Kelly, 2009).

#### **1.4. Fontes de inulina e FOS**

As frutanas encontram-se presentes em diversas plantas das famílias *Poaceae*, *Liliaceae* e *Compositae*. Na bibliografia são referidas diferentes fontes vegetais, apresentando diferentes teores de inulina. No quadro 2 encontram-se algumas dessas fontes vegetais e os teores mais frequentemente citados.

**Quadro 2 - Conteúdo em inulina de diferentes fontes vegetais**

Fonte	Parte comestível	Inulina (% de matéria fresca)
Chicória	Raiz	15-20
Tupinambo	Tubérculo	14-19
Cebola	Bolbo	2-6
Alho-porro	Bolbo	3-10
Alho	Bolbo	9-16
Alcachofra	Folhas	3-10
Yacon	Raiz	3-19
Barbas-de-bode	Raiz	4-11
Inhame	Raiz	8-13
Banana	Fruto	0,3-0,7

Fonte: Franck, 2006.

Desta forma, a inulina, embora em pequenas quantidades, encontra-se presente em alimentos do consumo alimentar corrente, como é o caso da cebola, alho e banana. Contudo, as fontes mais ricas nesta substância são a chicória e o tupinambo.

A inulina é obtida industrialmente sobretudo a partir de raízes de chicória, correspondendo esta frutana a cerca de 20% da matéria fresca e a 62-72% da matéria seca da raiz (Januário, 1999 e 2011). No entanto, o teor de inulina nesta planta, bem como o GP, variam de acordo com diversos factores, entre os quais as épocas de cultivo e de colheita, o espaço entre as plantas e o tempo de armazenagem (Januário, 1999; Oliveira *et al.*, 2004).

### 1.5. Obtenção industrial da inulina

Conforme referido, a chicória é a principal matéria-prima para a produção industrial de inulina. A inulina comercial é extraída por difusão em água quente a partir das raízes da chicória, ao que se segue a sua purificação e secagem por atomização (Park *et al.*, 2007). A inulina assim obtida apresenta-se, geralmente, em pó, facilitando o seu manuseamento, transporte e armazenamento (Toneli *et al.*, 2008b). Tem como características ser inodora e não possuir *flavour*, podendo possuir coloração branca a cinzenta, consoante o seu grau de purificação (Beirão-da-Costa *et al.*, 2005).

O extracto de inulina obtido industrialmente a partir da chicória pode apresentar compostos dos tipos GF<sub>n</sub> e F<sub>n</sub>, com GP entre 2 e 60, possuindo geralmente um GP<sub>m</sub> de 12. Este extracto terá ainda uma pequena percentagem (6-10%) de açúcares livres (frutose, glucose e sacarose) presentes na raiz. Em regra, cerca de 10% desta inulina apresenta um



GP entre 2 a 4 e 20% entre 5 e 9, o que corresponde aos FOS (Barreiros, 2009; Kelly, 2009). É ainda de salientar que esta frutana é constituída por cerca de 85-90% de frutose e 10-15% de glucose (Januário, 1999).

Para além do processo extractivo, a inulina comercial de menor GP (FOS) pode ser obtida por dois processos:

a. Hidrólise enzimática parcial da inulina utilizando uma enzima, endoinulinase, formando-se FOS que são uma mistura dos compostos  $GF_n$  e  $F_n$ , cujo GP varia entre 2 e 7 ( $GP_m=4$ ) (Franck, 2002; Roberfroid, 2007).

b. Síntese enzimática a partir da sacarose, utilizando uma enzima fúngica,  $\beta$ -frutósíase derivada da *Aspergillus niger* (transfrutósíase). Através da actividade enzimática, formam-se novas ligações  $\beta(2,1)$  pela adição sequencial de unidades de frutose, obtendo-se frutanas com um GP que varia entre 2 e 4 ( $GP_m \approx 3,6$ ). Partindo da molécula de sacarose, as frutanas desta mistura são todas do tipo  $GF_n$ , contendo na sua constituição glucose, frutose e alguma sacarose (Franck, 2002; Madrigal e Sangronis, 2007; Roberfroid, 2007; Kelly, 2009).

É de salientar que as amostras comerciais existentes no mercado, podem ser constituídas por uma mistura de FOS e inulina de GP maior que 10, apenas por FOS ou por inulina de GP mais elevado.

## **2. Métodos laboratoriais de obtenção e caracterização da inulina**

### **2.1. Extracção aquosa da inulina das raízes de chicória**

No que se refere à extracção laboratorial da inulina a partir de raízes de chicória, podem aplicar-se os seguintes métodos de extracção por difusão:

- a. Extracção aquosa a frio;
- b. Extracção em etanol a 80% (v/v) à temperatura ambiente;
- c. Extracção aquosa a quente.

Tendo em conta que a solubilidade da inulina depende do seu  $GP_m$ , bem como da temperatura a que o solvente se encontra (Simão, 2004), o rendimento do processo será diferente nos três tipos de extracção.

Relativamente à extracção aquosa, o rendimento é menor a frio, dada a baixa solubilidade da inulina a menor temperatura, cerca de 6% (Toneli *et al.*, 2008a), em particular da fracção de maior GP (Januário, 1999; Simão, 2004; Barreiros, 2009).

A extracção em água quente é, em geral, realizada a temperaturas entre 80 e 90 °C, durante 1h, com agitação contínua e moderada, aumentando a solubilização da inulina, para

cerca de 35% (Toneli *et al.*, 2008a). Este procedimento permite obter um extracto com toda a gama de glúcidos existentes, mais puro e com menor quantidade de compostos azotados (Januário, 1999; Oliveira *et al.*, 2004; Simão, 2004; Barreiros, 2009). Estudos de optimização da extracção desta frutana a partir de raízes de chicória revelam que a extracção aquosa a quente (variável resposta), quando avaliada pelo método de superfície resposta (RSM), aumenta de forma linear com o aumento da temperatura (aumento da solubilidade da inulina) e da relação água/massa seca (Oliveira *et al.*, 2004).

Uma vez que somente os açúcares simples e os oligossacáridos de baixo GP (inferior a 7) são solúveis em etanol a 80% (v/v) à temperatura ambiente, pode realizar-se previamente este tipo de extracção antes de submeter o material à extracção a quente, quando se pretende obter apenas a fracção glucídica cujo GP é superior a 7 (Januário, 1999; Simão, 2004; Barreiros, 2009).

Outros processos de extracção da inulina têm sido propostos, nomeadamente por Cataldo *et al.* (2005) que desenvolveram, no Brasil, um método de extracção com dióxido de carbono supercrítico. O processo decorreu em modo semi-contínuo através de um extractor alimentado com uma quantidade conhecida de raízes de chicória (14-15 gramas) e ajustando o banho de aquecimento à temperatura desejada (foram realizados ensaios às temperaturas de 40, 60 e 80 °C). Depois de atingida a temperatura de extracção, o dióxido de carbono entra no extractor impulsionado por uma bomba de alta pressão (foram utilizadas as pressões de 62, 100, 150 e 170 bar) e com um fluxo de 9,83 mL/min. Para manter o solvente no estado líquido, à entrada da bomba foi colocado um banho de gelo com sal à temperatura de -10 °C. O processo extractivo decorreu durante duas horas e o melhor resultado obteve-se para o binómio temperatura/pressão de 40 °C e 150 bar. Este método apresenta vantagens face à extracção convencional, devido ao elevado custo energético associado às etapas de secagem. Por outro lado, o solvente é bastante económico e seguro, sendo facilmente separado do extracto através de uma despressurização.

Refira-se ainda que, de acordo com a bibliografia consultada, a extracção de inulina pode ser efectuada quer a partir de raízes frescas quer de raízes desidratadas (secas ou liofilizadas).

## **2.2. Separação e Purificação da inulina**

Apresentando a inulina reduzida solubilidade a baixas temperaturas, quando uma solução deste composto é arrefecida ou congelada sofre uma separação de fases. A inulina precipita

como uma substância pastosa, enquanto que na fase líquida se encontram os açúcares simples e as frutanas de menor GP (Toneli *et al.*, 2008b).

Simão (2004) procedeu à congelação do extracto obtido após a extracção aquosa a quente, para que a fracção de maior GP precipitasse. Depois de descongelado, o extracto foi centrifugado (3500 rpm, durante 20 minutos), obtendo-se como resíduo, após remoção do sobrenadante, a inulina de massa molecular mais elevada (GP>10).

Segundo Leite *et al.* (2004), o extracto obtido a 70 °C, durante 1 hora, a partir de raízes de chicória trituradas, foi filtrado e concentrado até 24 °Brix antes de ser congelado -10 °C com vista à separação das duas fracções da inulina.

Já Toneli *et al.* (2007, 2008a) realizaram a extracção da inulina por difusão em água quente a partir de raízes lavadas, fatiadas e trituradas, a  $80 \pm 2$  °C durante 1 hora, com agitação constante. O extracto obtido foi filtrado e concentrado num evaporador a vácuo (a  $70 \pm 3$  °C) até 22 °Brix. Posteriormente, o extracto concentrado foi congelado a -24 °C, sendo centrifugado depois de descongelado até atingir os 25 °C, obtendo-se as fracções solúveis e precipitada desta frutana.

Também Barreiros (2009) procedeu à congelação do extracto concentrado, mas a -40 °C, seguida de descongelação, donde resultou a separação da inulina nas duas fases, encontrando-se os FOS na fase líquida sobrenadante e a inulina na fase precipitada (maior GP).

Segundo Simão *et al.* (2005), a remoção dos glúcidos de menor massa molecular retidos no precipitado da inulina pode realizar-se por dois processos: purificação da inulina com etanol a 80% e purificação da inulina com etanol a 80% e água. O primeiro processo envolve duas lavagens do resíduo com 30 mL de etanol a 80%, posterior centrifugação (3500 rpm durante 10 minutos com a remoção do sobrenadante) e liofilização do resíduo. O segundo processo compreende duas lavagens com etanol a 80%, posterior centrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas, seguida de duas lavagens com 30 mL de água destilada, com centrifugação (3500 rpm durante 10 minutos) e liofilização do resíduo.

Nos trabalhos realizados por Wack e Blaschek (2006) é referido que a concentração de etanol utilizada na purificação da inulina determina o GP<sub>m</sub> da fracção obtida.

Dobre *et al.* (2008) após efectuarem ensaios de extracção de inulina a 70 °C, a partir de raízes de chicória, usando como solventes água e soluções de etanol, aplicaram dois métodos de purificação. O primeiro método consistiu no recurso a uma filtração em leito de sílica gel e quitosana. O segundo método consistiu na remoção dos componentes ácidos,

pigmentos e corantes por permuta iónica, tornando o material incolor. Ambos os extractos purificados foram concentrados por evaporação.

De acordo com Lorenzo *et al.* (1999), o extracto de inulina obtido por imersão das raízes em água quente, contendo também frutose, glucose, sacarose, sais, gorduras, proteínas e aminoácidos, pode sofrer várias etapas de purificação. A remoção das proteínas e dos outros compostos polares pode alcançar-se por tratamento com cal, carbonatação e/ou por filtração com terra de diatomáceas ou siliciosa e posterior desionização com resinas permutadoras de iões. No caso de se pretender uma inulina de maior GP, esta é geralmente isolada por precipitação com etanol, por cromatografia ou por ultrafiltração. Estes autores aplicaram a ultrafiltração, não só como processo de purificação do extracto de inulina “bruto”, removendo os compostos de baixa massa molecular com uma membrana permeável (retenção dos compostos de maior massa molecular), mas também como processo de separação de fracções de inulina com diferentes GP<sub>m</sub> a partir do extracto.

### **2.3. Obtenção de inulina em pó**

Uma vez feita a separação e purificação da inulina a partir do extracto, procede-se à sua desidratação, sendo a liofilização a técnica que leva a menores alterações de estrutura deste polímero. Neste processo, a inulina é inicialmente congelada, ocorrendo posterior remoção da água sob a forma de vapor numa câmara de vácuo, através do fenómeno de sublimação. É de salientar que a liofilização apenas ocorre para valores de temperatura e pressão parcial de vapor inferiores aos do ponto triplo da água, ou seja, abaixo de 0,01 °C e de 610 Pa (Geankoplis, 2007). Este fenómeno decorre em três etapas (Barreiros, 2009; Carvalho, 2009):

1. Congelação a uma temperatura inferior a 0 °C, geralmente entre a -30 e -40 °C;
2. Secagem primária, fase em que ocorre a sublimação propriamente dita, eliminando-se cerca de 90% da água e ficando o produto com um teor de humidade de cerca de 15%;
3. Secagem secundária, que ocorre a uma temperatura entre 20 e 60 °C e sob vácuo, na qual é eliminada no máximo 10% da água ligada, ficando o produto com um teor de humidade até 2%.

Este processo permite uma elevada qualidade do produto seco, devido à rigidez estrutural proporcionada pela substância congelada, aquando da sublimação, prevenindo o colapso da restante estrutura porosa após a secagem. Quando se adiciona água ao produto liofilizado, este retém maior quantidade de água que o produto original. As baixas temperaturas inerentes a esta técnica permitem, também, preservar a composição do

produto e as suas propriedades nutricionais e sensoriais. Contudo é uma operação unitária dispendiosa devido aos elevados custos energéticos envolvidos.

#### **2.4. Determinação do Grau de Polimerização da Inulina**

O estudo de caracterização das frutanas, principalmente na fracção de inulina de maior comprimento de cadeia ( $GP > 10$ ) é, em geral, efectuado mediante a hidrólise completa da inulina em glucose e frutose. Estes glúcidos podem ser separados, identificados e quantificados por cromatografia gás-líquido (GLC) ou por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC). Em ambos os casos, o  $GP_m$  é estimado pela relação entre os teores de frutose e de glucose obtidos em resultado da hidrólise da inulina (Januário, 1999).

A hidrólise da inulina pode realizar-se por via enzimática ou ácida. A hidrólise enzimática é efectuada através de inulinases ( $\beta$ -frutofuranosidades) de origem microbiana, nomeadamente as  $\beta$ -1,2-frutana-frutanohidrolases, capazes de separar as várias unidades de frutose na inulina (Januário, 1999). A hidrólise ácida consiste numa hidrólise química em meio ácido (com ácido diluído, permitindo uma maior recuperação da frutose no hidrolisado) a temperaturas elevadas, decorrendo entre 70 e 100 °C (Januário, 1999). Neste processo de hidrólise, deve aumentar-se a acidez da solução de inulina, situando-se o pH entre 2-3. Contudo, para além da acidez e da temperatura, também o tempo de hidrólise deve ser controlado para que a mesma decorra da forma mais completa possível, sem que ocorra destruição da frutose (Januário, 1999). Os ácidos mais frequentemente utilizados na hidrólise da inulina são o clorídrico (Fleming e GrootWassink, 1979; Carioca *et al.*, 1988; Roquete *et al.*, 1989) e o sulfúrico (Guiraud e Galzy, 1981). No entanto, existem fontes que referem os ácidos fosfórico (Perschak e Wolfsehner, 1990), tartárico, oxálico, cítrico (Fleming e GrootWassink, 1979, Guiraud e Galzy, 1981) e trifluoracético (Pollock *et al.*, 1979; Sims *et al.*, 1991).

A utilização de um ácido concentrado na hidrólise da inulina dificulta a recuperação da frutose no hidrolisado, visto que este açúcar degrada-se facilmente, ocorrendo a formação de derivados, como o furfural (Januário, 1999).

É de salientar que, a estabilidade química da inulina depende do pH, da temperatura e do tempo de aquecimento. Segundo Glibowski e Bukowska (2011), a estabilidade química desta frutana diminui em meio ácido ( $pH \leq 4$ ), quando a temperatura aumenta para valores superiores a 60 °C. Para meios neutros ou alcalinos ( $pH \geq 5$ ), a estabilidade química da inulina não depende da temperatura até aos 100 °C.

Por via enzimática, são mais facilmente hidrolisados os FOS, face aos glúcidos de maior cadeia molecular, enquanto que, por via ácida a fracção de inulina com maior massa molecular é mais facilmente hidrolisada (Januário, 1999).

A ligação terminal glucose-frutose é mais facilmente hidrolisada no processo enzimático, uma vez que na hidrólise ácida se observa, e se mantém constante, uma elevada concentração de sacarose, revelando a dificuldade na quebra desta ligação (Januário, 1999).

A hidrólise enzimática apresenta, ainda, inúmeras vantagens face à ácida, exigindo um menor consumo energético, impedindo a mineralização do extracto e evitando a degradação dos glúcidos. De acordo com Januário (1999) e Simão (2004), no caso da inulina da chicória, a hidrólise enzimática revelou-se o processo mais eficaz.

Quanto à determinação analítica dos glúcidos, a técnica de HPLC apresenta inúmeras vantagens face à GLC: dispensa a derivatização dos compostos, permite a reprodução de separações em tempos curtos de análise, permite uma rápida e fácil quantificação destes compostos e permite maior rigor e precisão dos resultados obtidos (Conrad e Palmer, 1976; Chaplin e Kennedy, 1986; Januário, 1999).

Assim, a técnica de HPLC permite separar os constituintes da mistura, injectando um pequeno volume da amostra líquida numa coluna cromatográfica que contém uma fase sólida estacionária. Os componentes da mistura são então arrastados pela fase líquida móvel ao longo da coluna, distribuindo-se de acordo com a sua afinidade e solubilidade. À saída da coluna, os componentes da mistura são detectados por um detector que emite um sinal e o transmite ao integrador, permitindo a sua identificação e quantificação no registo cromatográfico através da medição da área dos picos obtidos ou da altura dos mesmos.

Na determinação de glúcidos por HPLC, em amostras que contenham açúcares simples e pequenos oligossacáridos, são utilizados detectores de índice de refração (IR), detector de maior sensibilidade, necessitando, no entanto, de um controlo rigoroso da temperatura (Januário, 1999).

O cálculo do teor de inulina, sobretudo quando inclui constituintes com GP maior que 7, bem como do seu  $GP_m$  é efectuado mediante (Januário, 1999; Simão, 2004):

- Doseamento dos açúcares livres no extracto ( $Glucose_i$ ,  $Frutose_i$  e  $Sacarose_i$ ), antes da hidrólise;
- Determinação dos açúcares totais ( $Glucose_t$  e  $Frutose_t$ ), no extracto hidrolisado, provenientes da hidrólise de inulina e de sacarose.

A partir destas determinações, calculam-se as concentrações dos monossacáridos constituintes da inulina (Glucose<sub>i</sub> e Frutose<sub>i</sub>), através das expressões 1 e 2.

$$G_i = G_t - G_l - G_s \quad (1)$$

$$F_i = F_t - F_l - F_s \quad (2)$$

onde  $G_s = F_s = \left(\frac{180}{342} \times S\right)$ , com  $PM_S = 342$  e  $PM_{F,G} = 180$ .

O teor de inulina e o seu  $GP_m$  calculam-se com base nas expressões 3 e 4, onde  $f$  representa o factor de correcção do aumento de massa devido ao ganho de água durante a hidrólise e  $n$  o número de unidades de frutose ligadas a uma molécula de glucose na molécula da inulina ( $GF_n$ ), sendo  $n=F_i/G_i$ .

$$I = f \times (G_i + F_i) \quad (3)$$

$$GP_m = n + 1 = (F_i/G_i) + 1 \quad (4)$$

O factor de correcção  $f$  é calculado pela expressão 5.

$$f = [(GP_m \times 180) - (GP_m - 1) \times 18] / (GP_m \times 180) \quad (5)$$

Refira-se que existem outras técnicas de cromatografia líquida de elevada eficiência que permitem caracterizar as frutanas sem ser necessário realizar o processo de hidrólise, permitindo separar os diferentes compostos constituintes da inulina de acordo com o seu GP. Esta separação é possível através da cromatografia de troca aniónica com detecção amperométrica (HPAEC-PAD). Esta técnica possibilita a identificação dos FOS (GP=3-10) e dos constituintes da inulina com maior GP, bem como a sua quantificação rigorosa desde que se disponha de padrões destes compostos (Januário, 1999; Borromei *et al.*, 2009).

### 3. Microencapsulamento em produtos alimentares

O microencapsulamento consiste num processo físico-químico no qual substâncias líquidas, sólidas ou gasosas são retidas no interior de uma película polimérica porosa, que

funciona como suporte e barreira física de protecção (Burgain *et al.*, 2011; Nedovic *et al.*, 2011; Parra-Huertas, 2010; Vos *et al.*, 2010).

A substância encapsulada, também designada por material de núcleo ou fase de carga, é dispersa numa matriz que a protege, designada por encapsulante, parede, revestimento, material de suporte, membrana, invólucro ou fase externa (Azeredo, 2005; Burgain *et al.*, 2011; Nedovic *et al.*, 2011).

Esta técnica pode aplicar-se com diversos objectivos:

- Reduzir a exposição e fornecer uma barreira de protecção entre materiais sensíveis (material do núcleo) e o ambiente exterior, controlando nomeadamente reacções oxidativas e outras alterações;
- Separar componentes reactivos ou incompatíveis;
- Reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo;
- Evitar reacções prematuras do encapsulado;
- Mascaram sabores, odores e cores indesejáveis;
- Melhorar a solubilidade do núcleo e a incorporação em sistemas secos;
- Estabilizar ingredientes alimentares e aumentar a sua biodisponibilidade;
- Diminuir a evaporação e degradação dos compostos voláteis do aroma.

Outro objectivo importante desta técnica é permitir a libertação sustentada e controlada do material de núcleo, para que esta seja feita lentamente no tempo ou a partir da ocorrência de um certo evento (controlo do início da libertação ou da taxa de libertação). Deste modo, evita-se a utilização ineficaz e a perda de compostos durante o processamento, promovendo a estabilidade e prolongando a durabilidade e o tempo de vida útil dos alimentos (Azeredo, 2005; Burgain *et al.*, 2011).

Dado que a natureza do material encapsulante influencia significativamente a estabilidade dos compostos encapsulados, a sua escolha deve atender (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Nedovic *et al.*, 2011) aos seguintes aspectos:

- propriedades físico-químicas deste material, nomeadamente solubilidade, massa molecular, transição vítrea, cristalinidade, difusibilidade, formação de filme e propriedades emulsionantes;
- propriedades físico-químicas do núcleo;



- compatibilidade para com o encapsulado;
- tipo de libertação;
- funcionalidade que deverá proporcionar no produto final;
- factores económicos.

O material de parede deve pois obedecer a requisitos, tais como, ser comestível, biodegradável, solúvel em água a um nível aceitável, insolúvel e não reactivo com o núcleo, apresentar boas propriedades reológicas (emulsionantes e de formação de filme), reduzidas higroscopicidade e viscosidade a elevadas concentrações de sólidos, sabor e odor suaves, fácil reconstituição e manuseamento e baixo custo (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Por este motivo, os polissacáridos, entre os quais o amido e seus derivados, exsudados de plantas e extractos, extractos marinhos e polissacáridos animais e microbianos são os materiais mais utilizados para o encapsulamento de compostos, dada a sua facilidade em se ligarem aos compostos encapsulados, à sua diversidade e ao seu baixo custo (Azeredo, 2005). Contudo, também os lípidos (ácidos gordos, ceras, glicéridos e fosfolípidos) e as proteínas (de soja, caseína, gelatina, proteínas formadoras de glúten) são apropriados a esta tecnologia (Nedovic *et al.*, 2011).

O material do núcleo, isto é, o encapsulado, pode ser um material cristalino, uma emulsão, uma suspensão de sólidos ou uma suspensão de microcápsulas pequenas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Entre as substâncias encapsuladas encontram-se sobretudo vitaminas, lípidos, corantes, prebióticos, probióticos, antioxidantes, aromas e óleos essenciais (Parra-Huertas, 2010).

### **3.1. Produção de microcápsulas**

A escolha do processo de microencapsulamento a adoptar depende de factores como o tamanho das partículas pretendido, as propriedades físicas e químicas dos materiais do núcleo e de parede, a aplicação pretendida para o produto final, os mecanismos desejados, a escala de produção e o custo (Azeredo, 2005). A funcionalidade química, a solubilidade e a difusão através da matriz formada determinam o grau de retenção dos constituintes do núcleo durante a produção das cápsulas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Existem várias técnicas de encapsulamento, desde processos químicos a processos físicos. Do primeiro tipo são a coacervação, co-cristalização, polimerização interfacial, gelificação iónica, incompatibilidade polimérica, encarceramento por lipossomas e inclusão molecular. Nos processos físicos incluem-se a atomização ou secagem por pulverização

(*Spray Drying*), secagem em leito por pulverização (*Spray-bed-drying*), revestimento em leito liofilizado (*Fluid-bed Coating*), congelação por pulverização (*Spray-chilling*), refrigeração por pulverização (*Spray-cooling*), fusão por injeção (*Melt Injection*), fusão por extrusão (*Melt Extrusion*), extrusão centrífuga, separação rotacional, leito fluidizante e encapsulamento com fluido super crítico (CO<sub>2</sub>) (Barreiros, 2009; Nedovic *et al.*, 2011; Parra-Huertas, 2010).

O método de encapsulamento mais aplicado na indústria alimentar é a atomização (*Spray Drying*), com uma representatividade de 80-90%. Neste processo, o produto líquido é atomizado e seco instantaneamente, dando-se a evaporação do solvente através de uma corrente de ar quente e obtendo-se desde partículas em pó de elevada qualidade e de pequeno tamanho (alguns micrómetros), característica de elevada importância do ponto de vista sensorial e de textura do produto final, a partículas de maior tamanho (alguns milímetros) (Barreiros, 2009; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Nedovic *et al.*, 2011).

Este processo apresenta como vantagens ser contínuo (permitindo produção em grande escala), versátil e económico (Nedovic *et al.*, 2011; Parra-Huertas, 2010). Por outro lado, possibilita uma rápida evaporação, produção de partículas pequenas de boa qualidade, boa retenção de compostos voláteis e elevado rendimento devido à elevada eficiência de encapsulamento (Parra-Huertas, 2010).

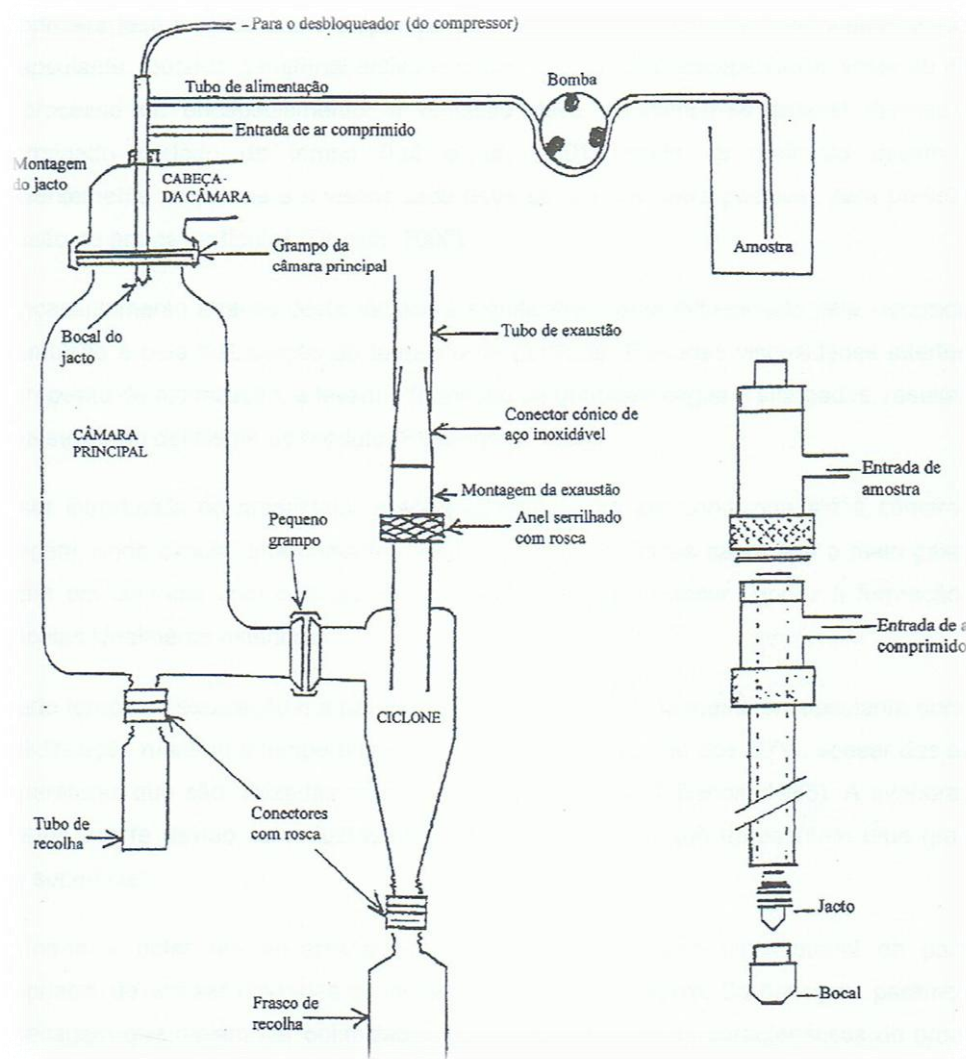
No entanto, apresenta algumas desvantagens, entre as quais, condições não uniformes da câmara de secagem e dificuldade em controlar o tamanho e a forma das cápsulas (o que condiciona as características do material seco), havendo, ainda, a possibilidade de aderência do material interno activo ao interior da matriz (Gharsallaoui *et al.*, 2007; King, 1984).

A remoção de água e a diminuição da actividade da água por este processo é frequentemente utilizada na indústria alimentar, assegurando a estabilidade microbiológica do produto final, prevenindo degradações químicas e/ou biológicas e associando baixos custos ao armazenamento e transporte. Esta técnica permite, ainda, obter produtos com propriedades específicas, como por exemplo, a solubilidade instantânea. Por esta razão, a tecnologia de *Spray Drying* foi desenvolvida na indústria dos lacticínios para produção do leite em pó, sendo, neste caso, a gordura do leite (material do núcleo) naturalmente protegida contra a oxidação pela mistura de lactose e proteínas do leite (material de parede) (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Podem utilizar-se três tipos de atomizadores: centrífugo, de pressão ou pneumático (Barreiros, 2009). O tipo de atomizador a utilizar depende da natureza e viscosidade do material a secar (solução, emulsão ou suspensão) e das características pretendidas para o

produto seco (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Quanto maior a quantidade de energia fornecida ao processo, mais finas são as partículas formadas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Num atomizador com fluxo de ar quente em co-corrente (figura 2), o líquido é pulverizado no mesmo sentido do fluxo de ar quente. A temperatura de entrada do ar quente encontra-se, geralmente, entre 150 e 220 °C, ocorrendo a evaporação instantânea de água, sendo as partículas secas expostas a temperaturas moderadas (50-80 °C) de forma a limitar degradações térmicas. Num atomizador com fluxo de ar em contracorrente, o líquido é pulverizado na direcção oposta ao fluxo de ar quente e o produto seco é sujeito a temperaturas elevadas não sendo o processo de secagem adequado a produtos termosensíveis (Gharsallaoui *et al.*, 2007).



**Figura 2 - Esquema do tipo de atomizador utilizado nos ensaios realizados**

Fonte: Barreiros (2009).

O processo de encapsulamento por atomização envolve três etapas (Barreiros, 2009; Gharsallaoui *et al.*, 2007):

- i. Preparação da solução/emulsão/suspensão estável do material do núcleo na solução do material de parede (dispersão do material activo, geralmente de natureza hidrofóbica, no meio que contém a matriz de encapsulamento, com a qual é imiscível);
- ii. Aquecimento e homogeneização da dispersão, com ou sem adição de agente emulsionante, consoante as propriedades emulsionantes do material de parede (alguns destes materiais apresentam actividade nas interfaces);
- iii. Atomização do líquido no interior da câmara de secagem (atomização da alimentação e desidratação das partículas atomizadas).

Segundo Gharsallaoui *et al.* (2007) quando as partículas do líquido entram em contacto com o ar quente, os balanços de temperatura e pressão de vapor parcial ficam estabilizados entre as fases líquida e gasosa. Assim, a transferência de calor é realizada do ar para o produto, como resultado da diferença de temperaturas, enquanto que a transferência de água é realizada na direcção oposta devido às diferenças de pressão de vapor. Com base na teoria fundamental da secagem, e de acordo com os mesmos autores, podem distinguir-se três fases:

- a. No momento imediatamente a seguir ao contacto entre o ar quente e o líquido, a transferência de calor provoca um aumento da temperatura das partículas de água até um valor constante;
- b. De seguida, a evaporação da água ocorre a uma temperatura constante e à pressão de vapor parcial da água, sendo a taxa de difusão da água, desde o núcleo até à superfície, considerada constante e igual à taxa de evaporação superficial;
- c. Quando o conteúdo de água das partículas atinge um valor crítico, forma-se uma crosta seca na superfície da partícula, a taxa de secagem rapidamente diminui e torna-se dependente da taxa de difusão de água através desta crosta. A secagem encontra-se teoricamente concluída quando a temperatura das partículas é igual à temperatura do ar.

Estas três fases têm durações diferentes, dependendo da natureza do produto a secar e da temperatura de entrada do ar. Se a temperatura de entrada do ar for elevada, forma-se rapidamente uma crosta seca devido à elevada taxa de evaporação da água. No início, o ar quente provoca um aumento da temperatura das partículas de água, promovendo a evaporação do líquido da superfície e uma correspondente contracção das partículas. A rápida migração da água para a superfície da partícula permite uma taxa de evaporação constante. Ao mesmo tempo as partículas suspensas formam uma rede contínua. No momento em que o ar e o líquido atomizado se misturam, dá-se a secagem de forma quase instantânea, ocorrendo uma evaporação intensiva na superfície de cada partícula. A evaporação ocorre tão rapidamente que as partículas se mantêm a baixas temperaturas até estarem secas, isto acontece devido à absorção de calor de vaporização pelo líquido.

Terminada a evaporação, a temperatura das partículas atinge a temperatura geral da câmara de secagem (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A separação entre o produto seco e o ar húmido é muitas vezes feita através de um ciclone colocado fora do secador, reduzindo as perdas de produto para a atmosfera. Assim sendo, as partículas mais densas são recolhidas na base da câmara de secagem e, as partículas mais finas passam através do ciclone para serem separadas do ar húmido (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

De forma a obter um microencapsulamento eficiente devem otimizar-se os seguintes parâmetros: temperatura de alimentação, temperatura de secagem (temperatura de entrada e de saída de ar), fluxo/velocidade de alimentação do produto a secar e tempo do processo (Barreiros, 2009; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Parra-Huertas, 2010).

A temperatura de alimentação influencia a viscosidade do produto líquido, o seu escoamento e a sua capacidade de ser pulverizado de forma homogênea. Quanto maior esta temperatura, menor a viscosidade e o tamanho das partículas. No entanto, maiores temperaturas provocam a volatilização ou degradação de alguns compostos termosensíveis. A velocidade de alimentação ao atomizador deve ser ajustada de forma a garantir que todas as partículas atomizadas atinjam os níveis de secagem desejados ao entrarem em contacto com a câmara de secagem. Também o ajustamento adequado da temperatura de entrada do ar, bem como do caudal, é importante. A temperatura de entrada do ar condiciona a velocidade relativa de secagem da cápsula e o teor de água final. Quando a temperatura de entrada do ar é baixa, a reduzida taxa de evaporação leva à formação de cápsulas com membranas de elevada densidade, elevado teor de água e facilidade de aglomeração (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Contudo, uma elevada temperatura de entrada do ar pode causar uma excessiva evaporação e, conseqüentemente, uma libertação prematura, a degradação do composto encapsulado e perda de compostos voláteis. A temperatura de saída do ar é difícil de determinar, pois depende das características de secagem do material (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Deve referir-se que as melhores condições de atomização são um compromisso entre uma temperatura do ar alta, uma elevada concentração de sólidos na solução, uma fácil pulverização e uma secagem sem que ocorra a expansão e/ou ruptura das partículas finais obtidas (Barreiros, 2009; Gharsallaoui *et al.*, 2007). Desta forma, a eficiência do microencapsulamento pode ser aumentada pelo aumento da concentração de sólidos da solução de parede e seu efeito na formação da superfície do núcleo, prévia à formação da crosta em torno das partículas secas.

### 3.2. Características das microcápsulas

As cápsulas formadas podem classificar-se de acordo com o seu tamanho em macrocápsulas ( $> 5000 \mu\text{m}$ ), microcápsulas ( $0,2 - 5000 \mu\text{m}$ ) ou nanocápsulas ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ).

Quando observadas ao microscópio, as cápsulas podem apresentar diferentes aspectos: serem mais ou menos esféricas de parede lisa ou enrugada, ocas ou encolhidas como resultado do modo de expansão da partícula ou possuírem à superfície pregas, rugosidades e mesmo orifícios (King, 1984).

Em geral, consideram-se os seguintes tipos de morfologia (figura 3):

- i. Sistema do tipo Reservatório, cápsula na qual o material de núcleo se encontra concentrado na região central e envolvido por um filme definido e contínuo do material de parede (microcápsulas);
- ii. Sistema do tipo Matricial, no qual o material activo (núcleo) se encontra uniformemente dissolvido ou disperso no material de parede ou matriz (microesferas).

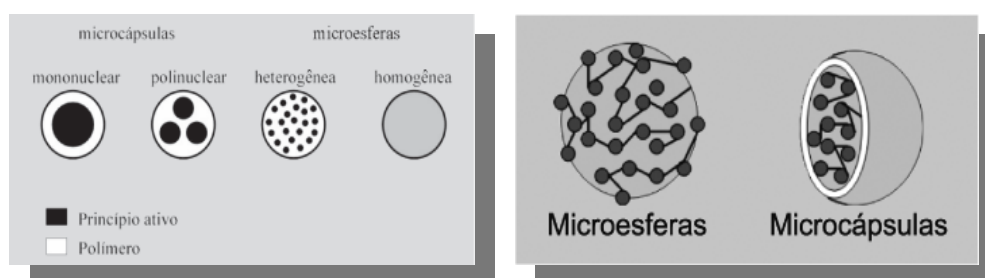


Figura 3 - Distinção entre microcápsula e microesfera

Assim, como é possível observar na figura 3, num sistema matricial, as microesferas apresentam uma pequena porção do material do núcleo (encapsulado) exposto na superfície. Já as microcápsulas podem apresentar mais que um núcleo ou várias paredes para o mesmo núcleo.

As diferenças no tamanho e morfologia das partículas durante a atomização estão relacionadas com a concentração da solução de alimentação e com a temperatura de secagem. Segundo Gharsallaoui *et al.* (2007), quanto maior a energia fornecida aquando da atomização, menor a dimensão das partículas secas e, para a mesma quantidade de energia fornecida, o tamanho das partículas aumenta com o aumento da taxa de alimentação.

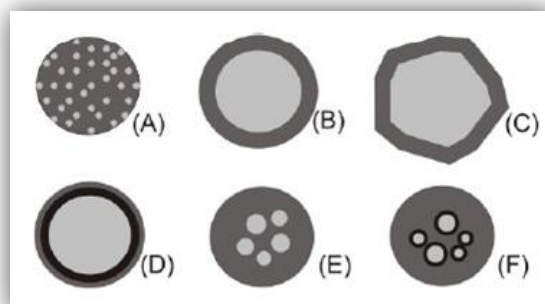
As propriedades tecnológicas das cápsulas obtidas por *Spray Drying* dependem, sobretudo, de interações entre partículas no que respeita ao escoamento do pó e, das interações partícula-líquido quanto à higroscopicidade e re-dispersibilidade.

Viscosidades elevadas interferem na atomização, conduzindo à formação de partículas grandes e alongadas, afectando de forma adversa a taxa de secagem (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Também a tendência de aderência e/ou aglomeração das cápsulas dependem da viscosidade da solução inicial (King, 1984).

É de salientar que o tamanho das partículas aumenta com o aumento da taxa de alimentação, bem como com a elevada viscosidade e tensão superficial da alimentação líquida inicial (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A morfologia influencia a densidade aparente das cápsulas, bem como a sua capacidade de re-hidratação e as perdas voláteis (King, 1984).

Na prática, e de acordo com as propriedades físico-químicas do núcleo, a composição do material de parede e a técnica de encapsulamento utilizada, podem formar-se diferentes tipos de partículas (figura 4): esfera simples envolvida por um revestimento de espessura uniforme, partícula de núcleo irregular, matriz contínua do material de parede constituída por várias partículas do núcleo, cápsula mononuclear de parede dupla, cápsula contendo vários núcleos no seu interior e microcápsulas em multicamadas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).



**Figura 4 - Diferentes tipos de partículas. (A): Matriz (microsfera); (B): Microcápsula simples; (C): Microcápsula simples irregular; (D): Microcápsula com duas paredes; (E): Microcápsula com vários núcleos; (F): Agrupamento de microcápsulas.**

## II – PARTE EXPERIMENTAL

### 4. Material e Métodos

#### 4.1. Material

Nos ensaios realizados foram utilizadas cinco amostras de Inulina/FOS provenientes da chicória, quatro comerciais e uma obtida em laboratório.

Na escolha destas amostras atendeu-se à variabilidade das características estruturais da inulina de acordo com as especificações que apresentam (quadro 3), de modo a que pudesse dispor-se de inulinas com diferentes  $GP_m$ .

**Quadro 3 - Amostras utilizadas nos ensaios realizados e suas especificações**

Nome da amostra	Origem	Especificações
Frutalose OFP	Comercial (Sensus)	Oligofrutose de elevada solubilidade com um $GP_{max}=10$ , cerca de 10% com um GP até 2 e 90% entre 3 e 10; 40% de poder edulcorante.
Beneo GR	Comercial (Beneo Orafiti)	Cerca de 92% de inulina e 8% de açúcares simples; $GP \geq 10$ ; 10% de poder edulcorante.
Inulina Padrão	Comercial (Merck)	Inulina purificada com elevado GP, para utilização bioquímica.
Beneo HPX	Comercial (Beneo Orafiti)	100% inulina; $GP \geq 23$ ; capaz de actuar como substituto de gordura a altas temperaturas.
Inulina Nativa purificada	Produzida no laboratório	Obtida a partir de chicória da variedade Oésia, cultivada em Portugal e com seis meses no terreno.

#### 4.2. Extracção, Separação e Purificação da inulina no laboratório

Na extracção da inulina foram utilizadas aparas de raízes de chicória, conservadas por congelação a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tendo-se seguido uma metodologia baseada na desenvolvida por Januário (1999).

Desta forma, a 5 gramas de aparas descongeladas adicionaram-se 50 mL de água destilada (relação 1:10). Colocou-se o *Erlenmeyer* contendo a mistura num banho de água termostaticado a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante uma hora, com agitação contínua e moderada. Depois de concluída a extracção a quente, filtrou-se o extracto obtido com o auxílio de uma gaze. Após arrefecimento, o extracto foi transferido para tubos que foram colocados no congelador a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante pelo menos dois dias.



Posteriormente retiraram-se os tubos do congelador e, após descongelação, observou a separação de fases. Para alcançar uma separação mais eficiente, realizou-se uma centrifugação durante 15 minutos a 3500 rpm, rejeitando-se o sobrenadante e recuperando-se o precipitado de inulina. Este foi posteriormente submetido a purificação, no sentido de isolar os constituintes com maior comprimento de cadeia, e de obter assim uma fracção de inulina de elevado GP<sub>m</sub>.

A purificação da inulina precipitada consistiu numa primeira lavagem com 30 mL de etanol a 80% e centrifugação (15 minutos, 3500 rpm), seguida de uma segunda lavagem com 30 mL de água destilada e nova centrifugação nas condições referidas. O precipitado pastoso resultante foi liofilizado, obtendo-se a inulina nativa purificada. Esta amostra foi preparada como as restantes (comerciais), quer para ser atomizada quer para caracterização analítica.

#### **4.3. Determinação do Grau de Polimerização Médio da inulina**

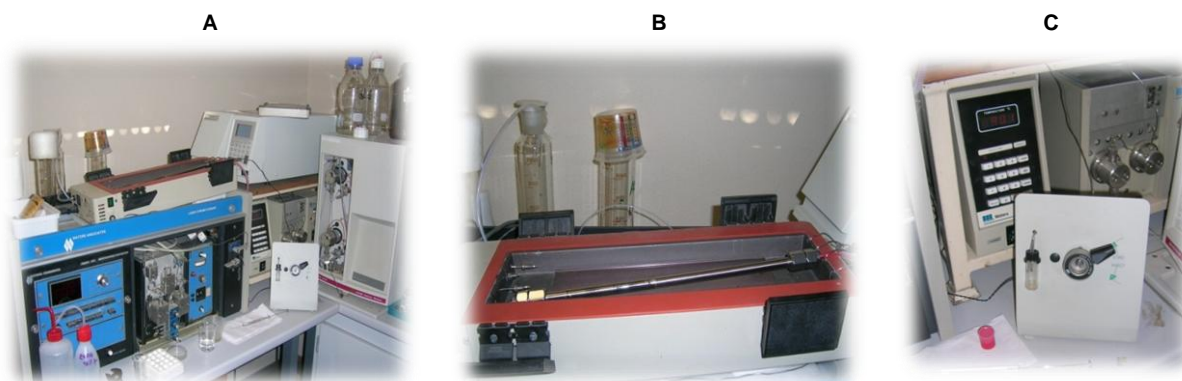
A caracterização analítica da inulina das diferentes amostras foi realizada por HPLC. Com este objectivo, prepararam-se soluções com uma concentração 1,4% (m/v) para um volume de 25 mL. Para tal, pesaram-se 0,35 gramas de cada amostra e adicionou-se uma pequena quantidade de água bidestilada para a sua dissolução (as amostras de maior GP foram solubilizadas em água aquecida a 80 °C). De seguida, as soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e completou-se o volume com água bidestilada. Filtraram-se as soluções com o auxílio de um dispositivo de filtração sob vácuo (Millipore), com membrana de porosidade 0,45 µm, e procedeu-se à análise por HPLC.

As soluções preparadas foram, também, sujeitas a uma hidrólise química, como método complementar à caracterização analítica das amostras por HPLC. Para este efeito, mediram-se 10 mL da solução de cada amostra, em duplicado, para um *Erlenmeyer* e acertou-se o pH até 2 com uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 6N. De seguida, colocaram-se as soluções a hidrolisar num autoclave a 121 °C, 1 atm e durante 30 minutos. Após arrefecimento neutralizou-se o pH com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 4N até ao pH inicial das soluções. Posteriormente transferiu-se quantitativamente o hidrolisado de cada amostra para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água bidestilada. Por fim, filtraram-se os hidrolisados com membrana filtrante de porosidade 0,45 µm e procedeu-se à sua análise por HPLC.

As amostras de inulina, com excepção da amostra Frutalose OFP, foram analisadas antes e após hidrólise num cromatógrafo líquido Waters (figura 5), equipado com um injectore Rheodyne, uma bomba Beckman modelo 125 NM, um detector de índice de refacção Waters modelo 2414 e um sistema de aquisição e tratamento de dados Beckman Karat 32

v.8. A coluna utilizada para o doseamento dos açúcares (frutose, glucose e sacarose) nas soluções e hidrolisados destas amostras foi a Sugar-Pak I (troca catiónica  $\text{Ca}^+$ ), a 90 °C, usando como solvente água ultra pura com EDTA-Ca ( $0,05 \text{ gL}^{-1}$ ), com um fluxo de  $0,5 \text{ mL/min}$ .

Foi injectado, em triplicado, um volume de  $20 \mu\text{L}$  das soluções e hidrolisados das amostras.



**Figura 5 - Equipamento de HPLC utilizado nas análises realizadas (A), Coluna Sugar-Pak I utilizada no doseamento de açúcares (B), Injector e controlador de temperatura da coluna (C)**

Foi utilizado também um outro equipamento idêntico ao primeiro, diferindo as condições analíticas apenas na existência de um módulo de pré-coluna (Wat 088141) instalado com SugarPak II inserts (Wat 015209) e no volume de injeção ( $50 \mu\text{L}$ ).

A quantificação foi efectuada com base numa curva de calibração obtida para cada composto padrão de açúcar – método do padrão externo (Anexo 1).

Na caracterização analítica da Frutalose OFP, constituída por FOS e açúcares simples (glucose, frutose e sacarose), não se procedeu à hidrólise da amostra, efectuando-se a determinação dos FOS e do seu  $\text{GP}_m$  apenas a partir da injeção da solução da amostra. Por este processo foi possível a separação, identificação e quantificação dos FOS, utilizando a coluna cromatográfica já referida, devido à disponibilidade de padrões de alguns destes compostos, nomeadamente 1-cestose (GF2) e nistose (GF3), para os quais se estabeleceram curvas de calibração usadas no doseamento (Anexo 1).

#### **4.4. Produção das microcápsulas de inulina**

Pretendeu-se estudar o efeito do  $\text{GP}_m$  das amostras de inulina sobre a dimensão média das microcápsulas e, além disso, avaliar a influência da temperatura de atomização e da concentração de sólidos sobre o mesmo parâmetro.

Desta forma, com o objectivo de avaliar os efeitos do GP<sub>m</sub> da inulina e da temperatura de secagem, prepararam-se, para cada amostra, soluções com 10% de concentração de sólidos e atomizaram-se a 120 e 190 °C. Para verificar a influência do teor de sólidos, prepararam-se, para três das amostras, soluções de diferentes concentrações, 5, 10 e 15%, e atomizaram-se a 190 °C (quadro 4).

**Quadro 4 – Condições dos ensaios de atomização das amostras de inulina**

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de sólidos (%)</b>	<b>Temperatura de secagem (°C)</b>
<b>Frutalose OFP</b>	5	190
	10	120 e 190
	15	190
<b>Beneo GR</b>	10	120 e 190
<b>Inulina Padrão</b>	5	190
	10	120 e 190
	15	190
<b>Beneo HPX</b>	10	120 e 190
<b>Inulina Nativa purificada</b>	5	190
	10	120 e 190
	15	190

Na preparação das soluções a atomizar dissolveram-se as amostras em água destilada, com recurso a um agitador magnético com aquecimento, até atingir 80 °C (temperatura à qual a inulina de maior GP dissolve).

Posteriormente procedeu-se à secagem por atomização das soluções num atomizador pneumático de modelo LAB-PLANT SD-05 (figura 6), à escala laboratorial, às temperaturas de 120 e 190 °C e velocidade de alimentação de 5,8 mL/min, condições utilizadas em trabalhos anteriores.



**Figura 6 - Atomizador utilizado nos ensaios realizados (D), Câmara de secagem do atomizador (E), Recolha através do ciclone da amostra atomizada (F)**

#### **4.5. Caracterização das microcápsulas de inulina**

A caracterização morfológica das partículas de inulina obtidas por atomização foi realizada recorrendo à microscopia electrónica de varrimento (SEM). Esta técnica permite observar e, também, caracterizar a superfície das partículas, através de imagens obtidas pela variação da reflexão de um feixe de electrões quando este embate na superfície das amostras previamente cobertas com uma fina camada de ouro.

Assim, as amostras atomizadas, indicadas no quadro 4 (vd. 5.4.), foram sujeitas a um banho de ouro (mistura de 95% ouro com 5% de paládio) num sputter coated Polaron E5350 de forma a preservar a superfície da amostra e aumentar o sinal observado.

As amostras com esta preparação foram observadas e fotografadas no microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-5410, com uma voltagem de aceleração de 10kV. As imagens obtidas em formato digital foram tratadas pelo programa SemAfore versão 5.0.

#### **4.6. Análise estatística dos resultados**

Os resultados quer da análise por HPLC das amostras de inulina, quer da caracterização por SEM das amostras de inulina atomizadas, foram submetidos a tratamento estatístico, através da análise ANOVA com o programa Statistica versão 7, e fazendo a comparação de médias pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Separação e purificação da fracção de maior GP da inulina nativa do extracto

A eficácia do processo de separação e purificação da fracção de inulina de maior GP presente no extracto pode observar-se na figura 7, por comparação dos perfis cromatográficos desta fracção (inulina nativa purificada) e do extracto “bruto” de chicória.

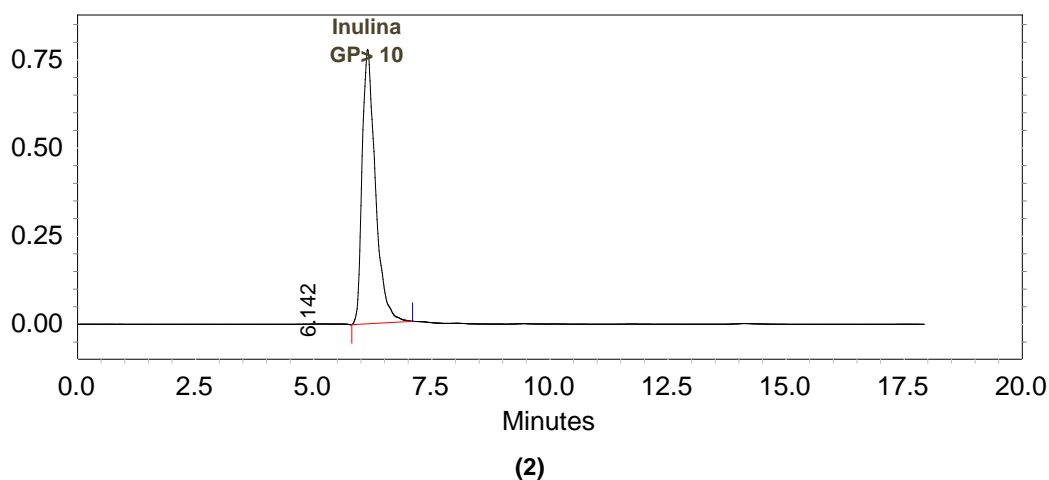
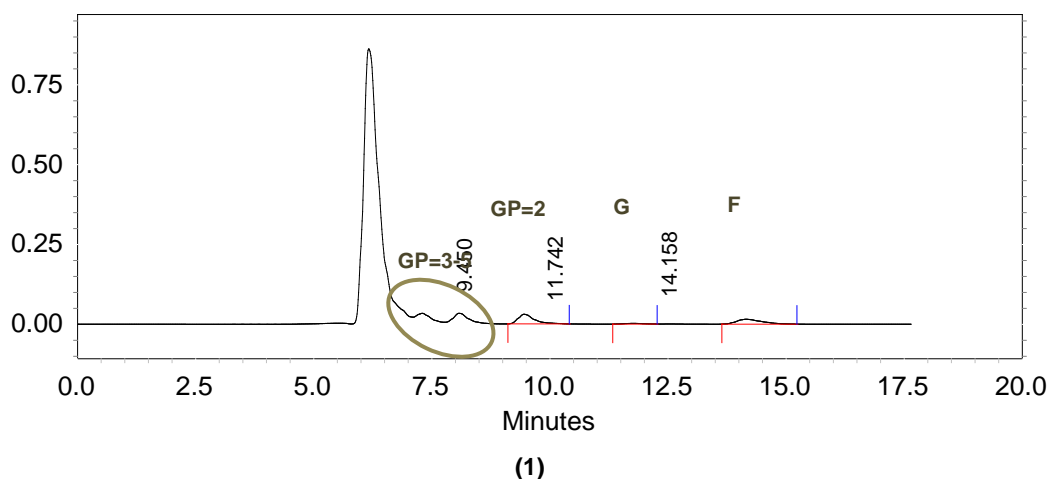


Figura 7 – Registos cromatográficos obtidos por HPLC do Extracto (1) e da Inulina Nativa Purificada (2)

Verifica-se que na amostra de Inulina Nativa Purificada passou a existir um único pico, correspondente à fracção de inulina de maior GP (superior a 10), com total ausência dos compostos glucídicos de menor massa molecular.

Este resultado traduziu-se no aumento do  $GP_m$  da inulina do extracto “bruto”, para o qual foi determinado inicialmente o valor de 12, o que comprova ter-se conseguido reunir os constituintes da inulina de maior comprimento de cadeia na amostra nativa purificada.

## 5.2. Determinação do Grau de Polimerização Médio da inulina das amostras

No gráfico da figura 8 apresentam-se os valores de  $GP_m$  calculados com base nos resultados da determinação dos constituintes glucídicos das amostras (vd. Anexo 3).

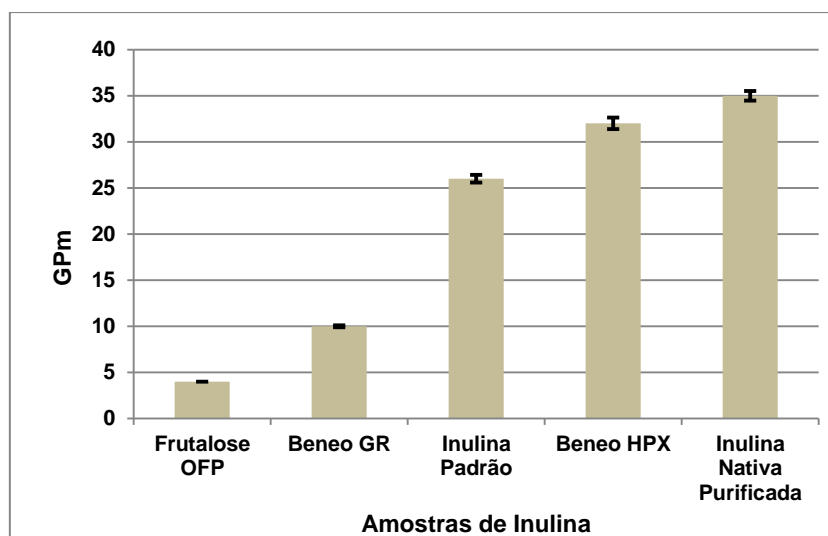


Figura 8 - Graus de polimerização médio determinado por HPLC para as amostras de inulina

(As barras no topo das colunas representam o desvio padrão; n=3)

Verifica-se que as amostras correspondem a inulina que se apresenta com diferentes comprimentos médios de cadeia.

A Frutalose OFP mostrou ser a única amostra onde estão ausentes os constituintes de inulina com GP maior que 10, ou seja, é constituída apenas por FOS, tendo-se determinado um  $GP_m$  de 4.

Já a Beneo GR, para a qual se obteve o valor 10 para o  $GP_m$ , apresenta na sua constituição uma mistura de FOS e inulina de GP mais elevado (vd. Anexo 2).

As amostras Inulina Padrão, Beneo HPX e Inulina Nativa Purificada apresentam  $GP_m$  de 26, 32 e 35, respectivamente, possuindo apenas inulina de maior GP na sua composição, conforme se pode observar nos registos cromatográficos destas amostras, apresentados no Anexo 2, os quais se assemelham bastante.

A análise estatística dos resultados permitiu concluir que o  $GP_m$  das diferentes amostras analisadas difere muito significativamente ( $p\text{-value} < 0,001$ ).

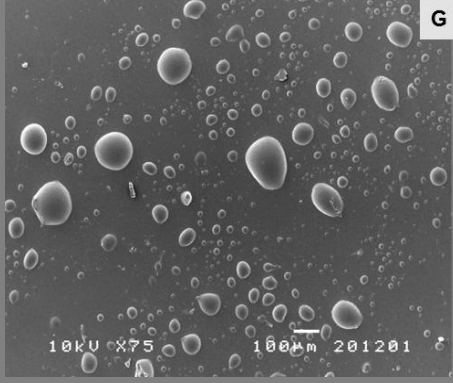
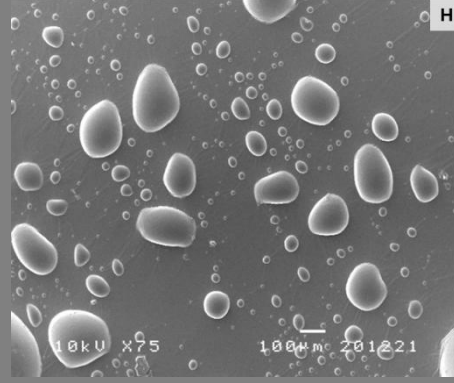
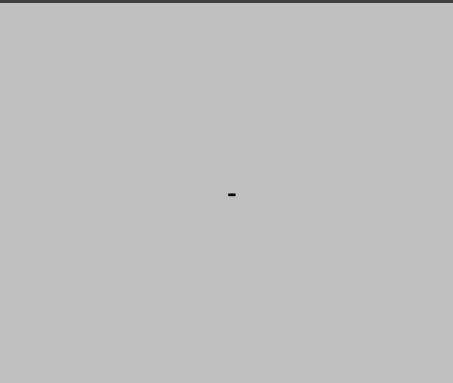
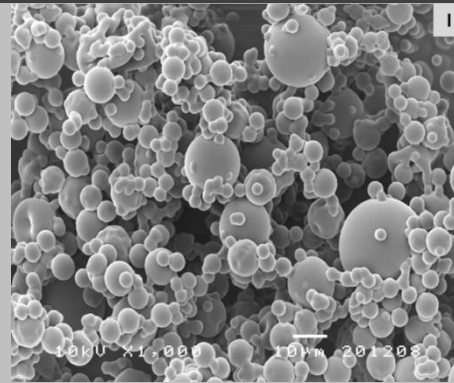
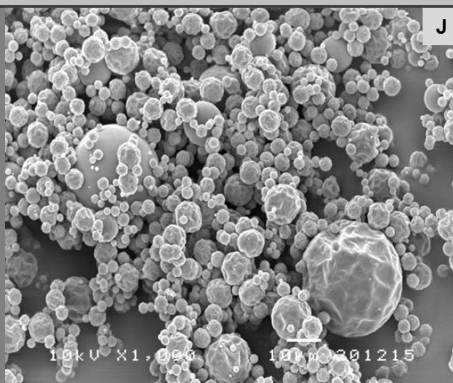
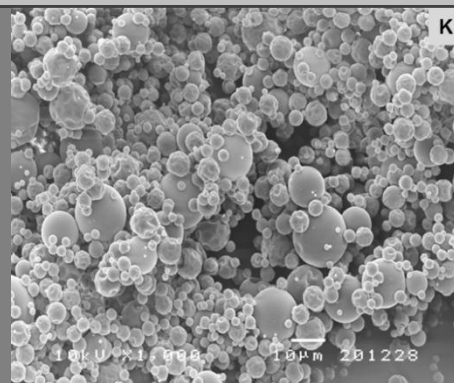
Assim, com base nos valores de  $GP_m$  obtidos para as diferentes amostras, é possível considerar apenas três “inulinas” marcadamente diferentes, uma vez que se constatou que as amostras de maior GP apresentam  $GP_m$  relativamente próximos.

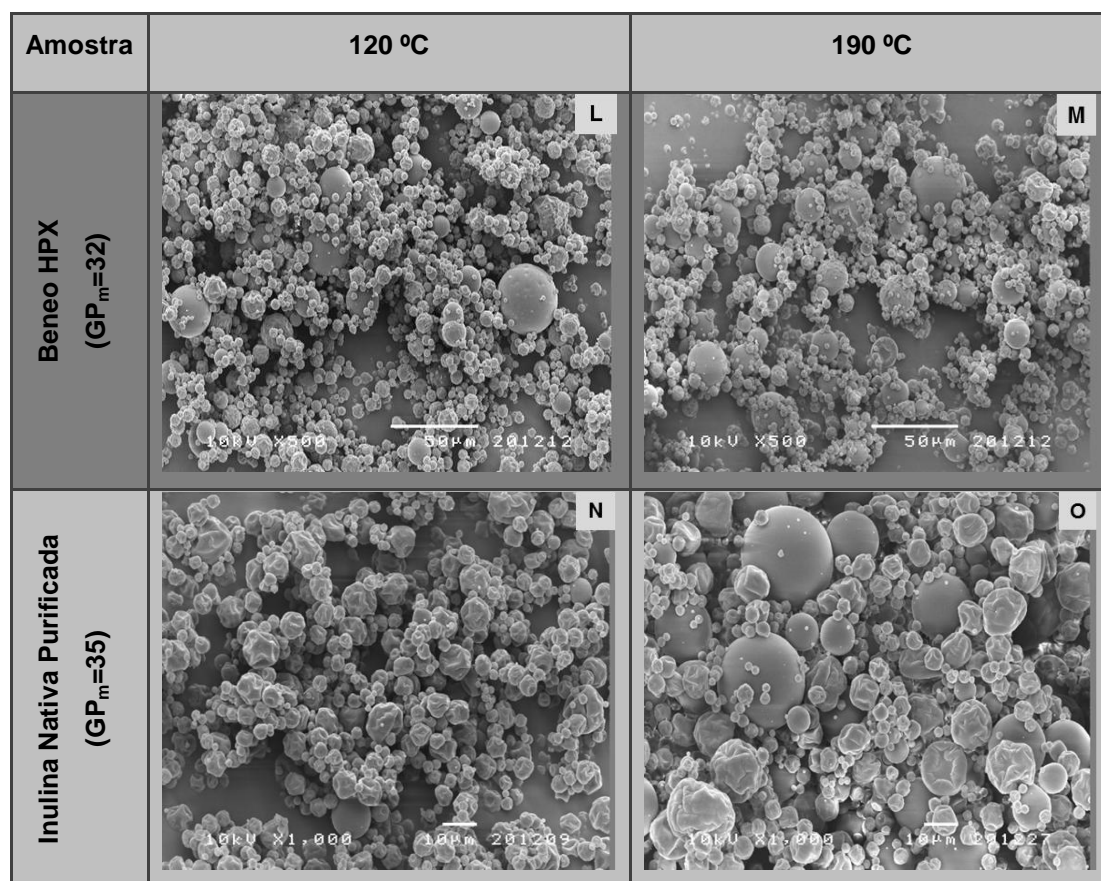
### 5.3. Caracterização das microcápsulas de inulina por SEM

#### 5.3.1. Efeito do $GP_m$ e da temperatura de atomização

O efeito do  $GP_m$  da inulina, assim como da temperatura de atomização, no aspecto morfológico das partículas formadas por atomização pode verificar-se nas amostras de FOS e inulina de maior GP, representadas no quadro 5.

**Quadro 5 - Imagens, obtidas por SEM, das diferentes amostras de inulina (10% de teor de sólidos) atomizadas a 120 e 190 °C**

Amostra	120 °C	190 °C
Frutalose OFP ( $GP_m=4$ )		
Beneo GR ( $GP_m=10$ )		
Inulina Padrão ( $GP_m=26$ )		



As microcápsulas da amostra Frutalose OFP (G e H) apresentam uma elevada heterogeneidade de diâmetros, variando entre 5 e 200 µm quando atomizada a 120 °C e entre 1 e 400 µm a 190 °C. Estas microcápsulas apresentam forma ovóide, de superfície lisa e contínua, com ausência de depressões.

No caso da amostra Beneo GR (I), apenas foi possível analisar a imagem obtida por SEM à temperatura de 190°C, o que torna inviável a avaliação comparativa do efeito deste parâmetro. Esta situação, resultante da observação microscópica de aglomeração e/ou aderência das partículas formadas, ocorreu também para outras amostras em primeiros ensaios da sua preparação para observação por SEM mas foi posteriormente ultrapassada. Este comportamento indica, pois, alguma dificuldade de manuseamento da inulina devido à sua elevada higroscopicidade.

Deste modo, a 190 °C, as microcápsulas desta amostra possuem alguma heterogeneidade de diâmetros, situados no intervalo 2 – 28 µm, apresentando-se sob a forma de esferas de superfície lisa e contínua, por vezes, com depressões.

Por outro lado, as imagens da amostra Inulina Padrão obtidas por SEM (J e K) evidenciam microcápsulas com menor heterogeneidade de diâmetros, com 2 – 32 µm quando atomizada a 120 °C e 1,5 – 16 µm para 190 °C. Quanto ao seu aspecto morfológico apresentam-se como esferas na sua maioria com superfície lisa e contínua. Porém, é visível



a presença de microcápsulas de parede enrugada e com depressões, sobretudo, para a menor temperatura de atomização.

Já as fotografias SEM das microcápsulas da amostra Beneo HPX (L e M) indicam, também, uma menor amplitude de dispersão de diâmetros, 3 – 37  $\mu\text{m}$  quando atomizada a 120 °C e 2 – 35  $\mu\text{m}$  para 190 °C. Quanto à morfologia, estas microcápsulas apresentam igualmente forma esférica com a superfície lisa e contínua. Contudo, também neste caso, quando atomizada a 120 °C, a amostra forma microcápsulas enrugadas e com depressões.

No respeitante à Inulina Nativa Purificada (N e O), as microcápsulas desta amostra possuem alguma heterogeneidade de tamanhos, 2 – 15  $\mu\text{m}$  para 120 °C e 2 – 28  $\mu\text{m}$  para 190 °C. No que diz respeito ao seu aspecto e morfologia, estas microcápsulas apresentam-se, sobretudo, esféricas de superfície lisa e contínua. No entanto, observam-se microcápsulas com superfície enrugada e com depressões, sobretudo, para a menor temperatura de atomização.

Considerando o conjunto das diferentes amostras de inulina, pode concluir-se que a amostra Frutalose OFP, constituída exclusivamente por FOS, origina microcápsulas redondas e achatadas, de parede contínua e uniforme, com dimensão média marcadamente superior à das outras amostras, independentemente da temperatura de atomização. Já as restantes amostras (possuindo constituintes da inulina com  $\text{GP} \geq 10$ ) formam microcápsulas essencialmente esféricas de parede lisa e contínua com presença de enrugamentos e depressões, principalmente quando a temperatura de atomização é mais baixa (120°C). Também Toneli *et al.* (2008a) e Barreiros (2009) verificaram que a temperatura de secagem influencia a superfície das microcápsulas formadas, sendo esta mais lisa e homogênea, quanto maior a temperatura de atomização.

Uma vez que o efeito do  $\text{GP}_m$  no diâmetro médio das microcápsulas aparenta ser dependente da temperatura, parece haver influência de outros factores, nomeadamente a presença de FOS ou de inulina de maior GP nas amostras.

Por outro lado, as microcápsulas obtidas a 120 °C apresentavam-se mais enrugadas e com depressões, pelo que, o diâmetro medido não traduz o seu diâmetro “real”. Este facto sugere que os resultados obtidos para 190 °C traduzem melhor o efeito do comprimento médio da cadeia da inulina sobre a dimensão das microestruturas formadas.

No quadro 6 está expresso o efeito do  $\text{GP}_m$  da inulina, bem como da temperatura de atomização, no diâmetro médio das microcápsulas formadas.

**Quadro 6 - Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das microcápsulas das amostras de inulina atomizadas a 120 e 190°C, para 10% de teor de sólidos**

Amostras de inulinas	120 °C	190 °C
Frutalose OFP ( $\text{GP}_m=4$ )	24,23 <sup>aA</sup> $\pm$ 20,19	31,85 <sup>aB</sup> $\pm$ 37,33
Beneo GR ( $\text{GP}_m=10$ )	-	5,340 <sup>b</sup> $\pm$ 3,153
Inulina Padrão ( $\text{GP}_m=26$ )	6,076 <sup>bA</sup> $\pm$ 3,110	4,682 <sup>bB</sup> $\pm$ 2,525
Beneo HPX ( $\text{GP}_m=32$ )	9,072 <sup>cA</sup> $\pm$ 4,754	5,880 <sup>bB</sup> $\pm$ 3,757
Inulina Nativa Purificada ( $\text{GP}_m=35$ )	5,734 <sup>dbA</sup> $\pm$ 1,998	6,168 <sup>bA</sup> $\pm$ 4,071

Para cada coluna, valores seguidos da mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ); para cada linha, valores seguidos da mesma letra maiúscula, não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Em relação à amostra Beneo GR, pelas razões já referidas, só foi possível obter as dimensões das cápsulas a 190 °C, pelo que não se pôde avaliar o efeito da temperatura de atomização neste parâmetro.

Analisando o efeito do  $\text{GP}_m$  no diâmetro médio, para a temperatura de 120 °C verificou-se que a amostra Frutalose OFP ( $\text{GP}_m=4$ ) difere significativamente ( $p\text{-value}=0,000008$ ) das restantes amostras. A amostra Inulina Padrão ( $\text{GP}_m=26$ ) é significativamente diferente ( $p\text{-value}=0,035255$ ) da amostra Beneo HPX, mas não é significativamente diferente da amostra Inulina Nativa Purificada. As amostras de maior GP, Beneo HPX e Inulina Nativa Purificada (com 32 e 35 de  $\text{GP}_m$ , respectivamente) são significativamente diferentes entre si ( $p\text{-value}=0,014161$ ).

Para a temperatura de 190 °C verificou-se, novamente, que a amostra Frutalose OFP ( $\text{GP}_m=4$ ) é significativamente diferente ( $p\text{-value}=0,000017$ ) das restantes amostras. Contudo, as outras amostras de inulina (com maior  $\text{GP}_m$ ) não apresentam dimensões significativamente diferentes entre si.

Considerando o efeito da temperatura de atomização, o aumento deste parâmetro de 120 para 190 °C, provocou um aumento significativo ( $p\text{-value}=0,000478$ ) do diâmetro médio das microcápsulas da amostra Frutalose OFP. O mesmo aumento de temperatura conduziu à formação de partículas de tamanho médio significativamente menor, no caso das amostras Inulina Padrão e Beneo HPX ( $p\text{-value}=0,000009$ ). No entanto, para a amostra Inulina Nativa Purificada, conclui-se que, quando atomizada às duas temperaturas apresenta dimensões médias que não são significativamente diferentes.

Analisando a distribuição de frequências (quadro 7), a amostra Frutalose OFP (3 e 4), apresenta para ambas as temperaturas maior percentagem de microcápsulas com diâmetros compreendidos entre 10,1 - 25  $\mu\text{m}$ , possuindo 80% das microcápsulas diâmetros inferiores a 35  $\mu\text{m}$ .

Já a amostra Beneo GR (5), para a temperatura de 190 °C, regista maior percentagem de microcápsulas com diâmetros compreendidos entre 1 – 5 µm, apresentando 80% das microcápsulas diâmetros inferiores a este valor.

Na amostra Inulina Padrão (6 e 7) é visível uma maior percentagem de microcápsulas com diâmetros entre 5,1 – 10 µm para 120 °C e 1 – 5 µm para 190 °C, possuindo 80% das microcápsulas diâmetros inferiores a 10 µm para 120 °C e até 5 µm para 190 °C.

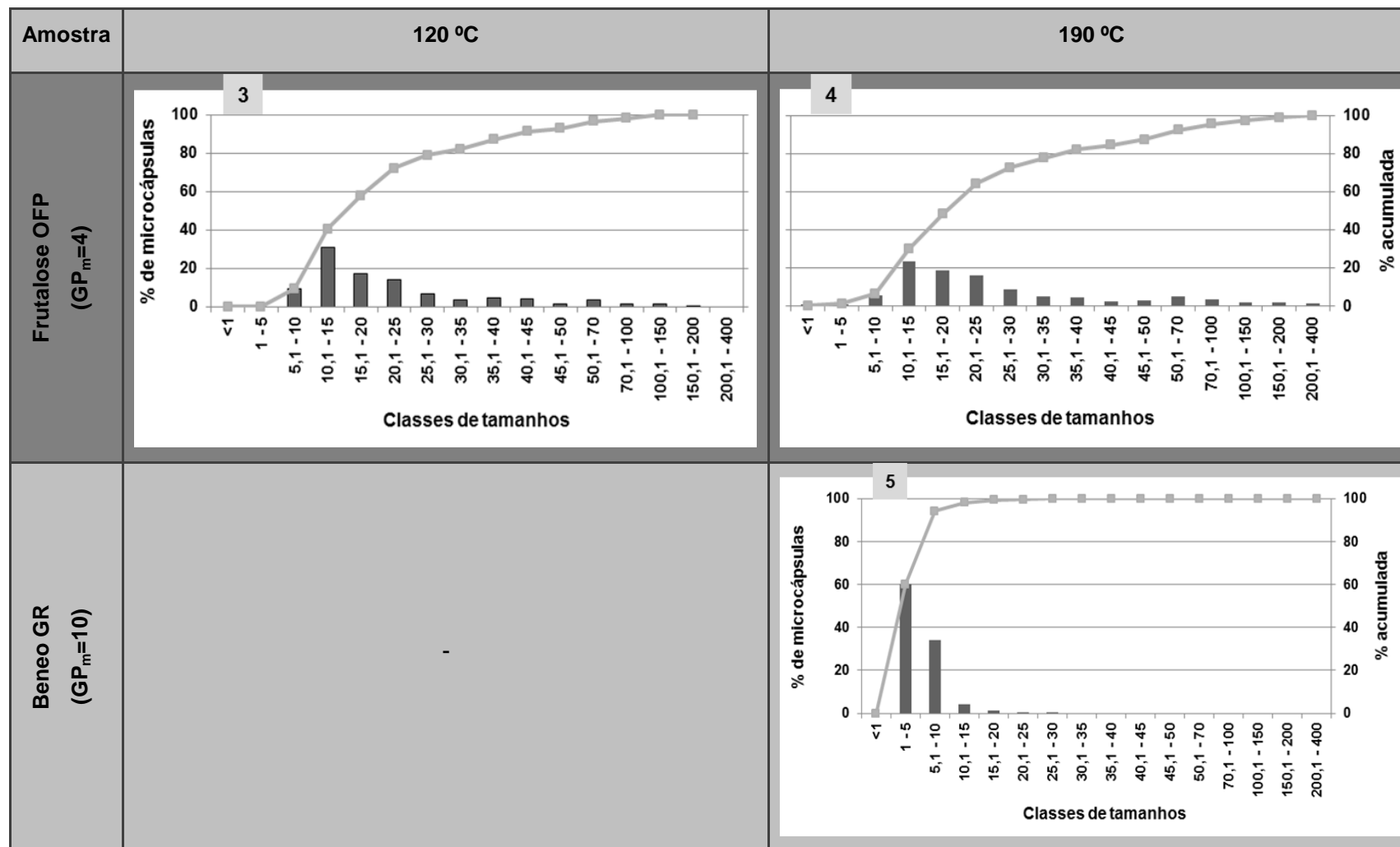
Também para as amostras Beneo HPX (8 e 9) e Inulina Nativa Purificada (10 e 11), se observa que a maior percentagem de microcápsulas apresenta diâmetros compreendidos entre 5,1 – 10 µm para a temperatura de 120 °C e 1 – 5 µm para 190 °C. Independentemente da temperatura de atomização, 80% das microcápsulas têm diâmetros até 10 µm, e mesmo inferiores a este valor na Inulina Nativa Purificada.

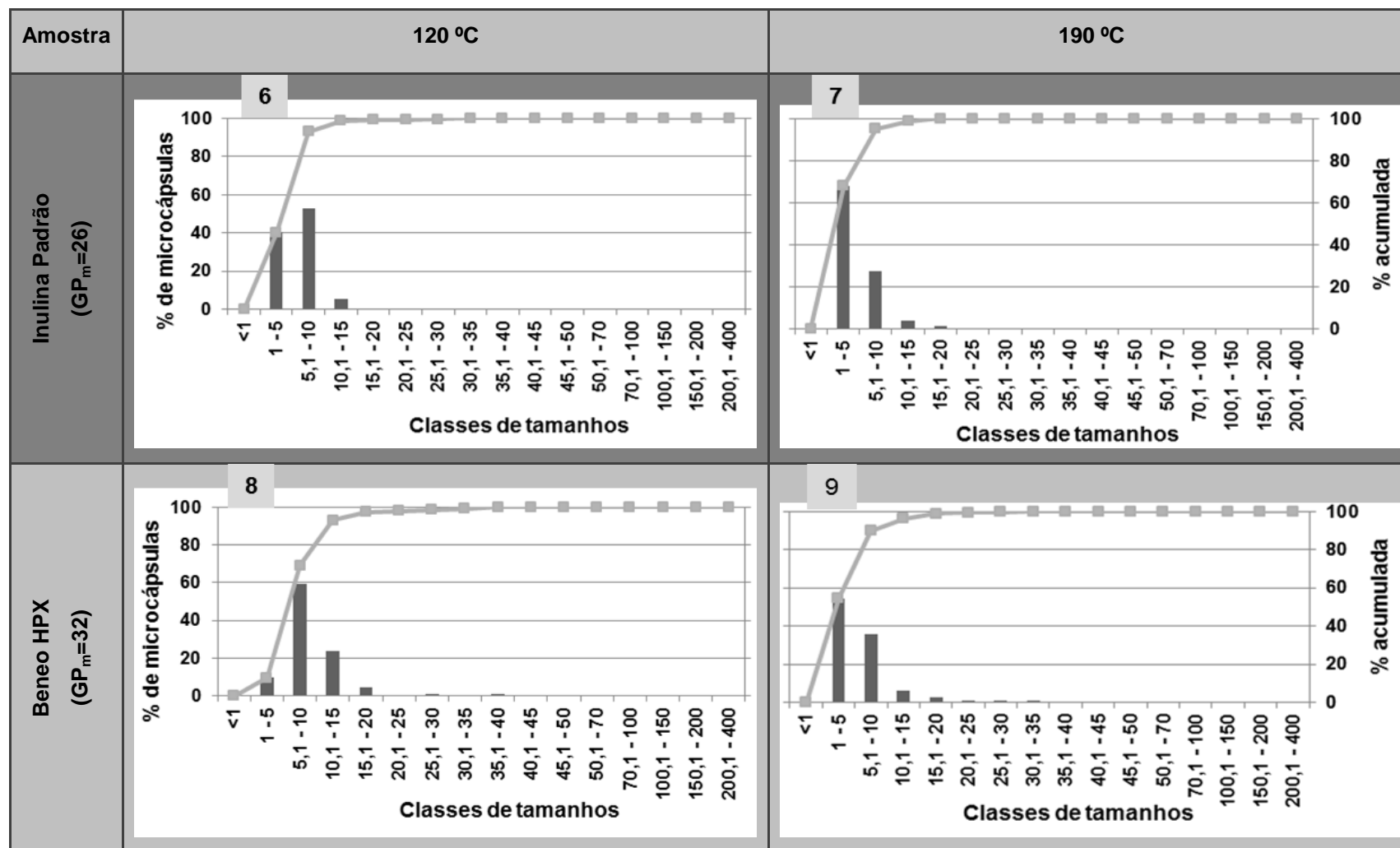
No que diz respeito à análise quantitativa dos resultados, o efeito da temperatura traduz-se numa diferença significativa de diâmetros médios para a amostra Frutalose OFP (aumento de cerca de 33%, com a elevação da temperatura), bem como para as amostras Inulina Padrão e Beneo HPX (redução de cerca de 17 e 33%, respectivamente). Contudo, para a amostra Inulina Nativa Purificada, este efeito não origina uma diferença significativa dos diâmetros médios das suas microcápsulas. Estes resultados sugerem que, para o efeito da temperatura de atomização, talvez exista influência da composição da inulina das amostras (exclusivamente FOS ou inulina de  $GP \geq 10$ ) no tamanho das partículas. Desta forma, a presença de FOS parece conduzir a um aumento do diâmetro médio das microcápsulas com o aumento da temperatura de atomização, enquanto que a fracção de inulina de maior GP leva ao efeito inverso. No entanto, a partir de um  $GP_m$  muito elevado, na ordem dos 35, este efeito deixa de se notar.

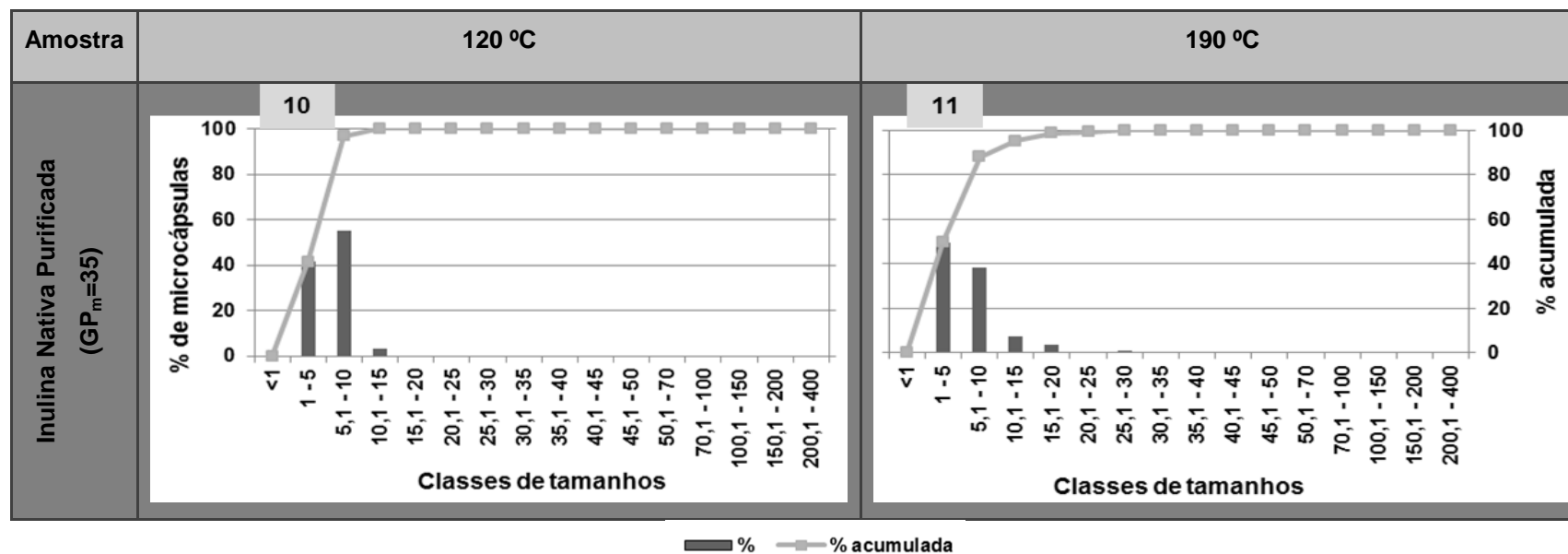
Uma vez que, de todas as amostras, a Frutalose OFP é a única que não possui na sua constituição fracções de inulina de maior GP ( $GP > 10$ ), nesta amostra poderá fazer-se sentir, eventualmente, o efeito de uma menor viscosidade em solução e/ou maior solubilidade em água sobre o diâmetro das partículas formadas por atomização. Esta característica poderá justificar os maiores diâmetros encontrados para a Frutalose OFP, relativamente às amostras que apresentam na sua composição fracções de inulina de maior GP, o que provavelmente lhes confere maior viscosidade e menor solubilidade.

Esta variabilidade de comportamento das diferentes inulinas, em resposta à variação da temperatura de secagem, não se encontra reportada na bibliografia consultada. Apenas é referido por Barreiros (2009) que o aumento do GP, bem como da temperatura de atomização, conduz à diminuição do tamanho médio das partículas obtidas.

Quadro 7 - Distribuição de frequências das diferentes amostras de inulina (10% de teor de sólidos) atomizadas a 120 e 190 °C







### 5.3.2. Efeito do Teor de Sólidos

O efeito do teor de sólidos na morfologia das microcápsulas formadas por atomização a 190 °C, para as diferentes amostras utilizadas, é apresentado nas imagens obtidas por SEM presentes no quadro 8.

Na amostra Frutalose OFP (P, Q e R) verifica-se uma grande heterogeneidade de tamanhos das microcápsulas, variando os mesmos entre 6 – 200  $\mu\text{m}$  para um teor de sólidos mais baixo (5%) e 5 – 200  $\mu\text{m}$  para um teor mais elevado de sólidos (15%). Quanto ao aspecto morfológico, as microcápsulas observadas apresentam a mesma forma ovóide de superfície lisa e contínua, sem depressões.

No caso da amostra Inulina Padrão (S, T e U) a heterogeneidade de tamanhos das microcápsulas é semelhante, independentemente do teor de sólidos, variando a dimensão média entre 1 – 23  $\mu\text{m}$ . Em relação à morfologia das microcápsulas observadas, estas apresentam-se com a mesma forma esférica de superfície regular lisa e contínua, ocorrendo, por vezes, enrugamentos e presença de depressões.

Por outro lado, na amostra Inulina Nativa Purificada (V, X e Y) é visível uma heterogeneidade de tamanhos das microcápsulas idêntica para os teores de sólidos de 5 e 10%, variando os mesmos entre 1 – 30  $\mu\text{m}$ . Já para o teor de sólidos de 15%, a heterogeneidade de tamanhos é maior, variando entre 2 – 56  $\mu\text{m}$ . Quanto ao seu aspecto, as microcápsulas são, igualmente, esferas de superfície lisa e contínua, aparecendo, em alguns casos, engelhamentos e depressões.

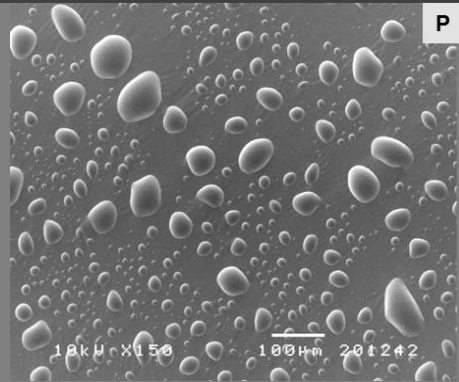
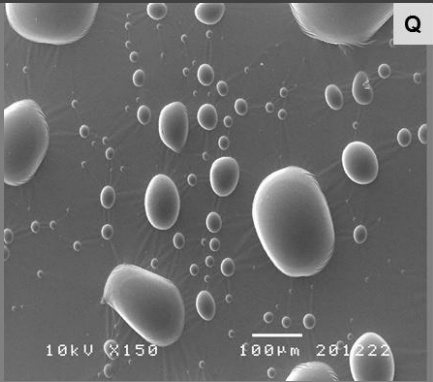
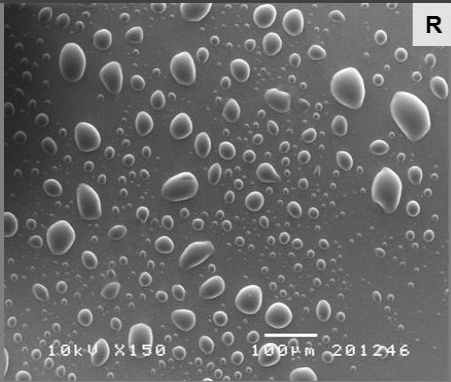
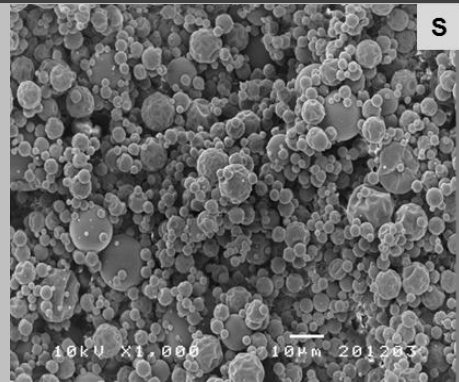
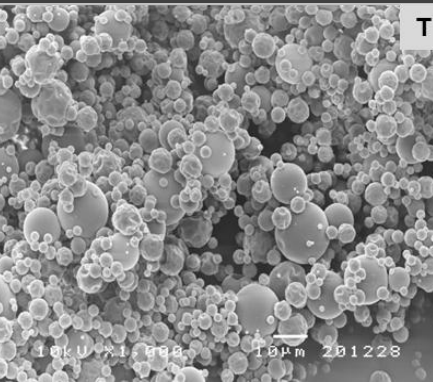

Quanto ao efeito do teor de sólidos das inulinas, com  $GP_m$  entre 4 e 35, na dimensão média das microcápsulas formadas, registaram-se os resultados reunidos no quadro 9.

**Quadro 8 - Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ) e desvio padrão das microcápsulas das amostras de inulina atomizadas a 190 °C, para diferentes teores de sólidos**

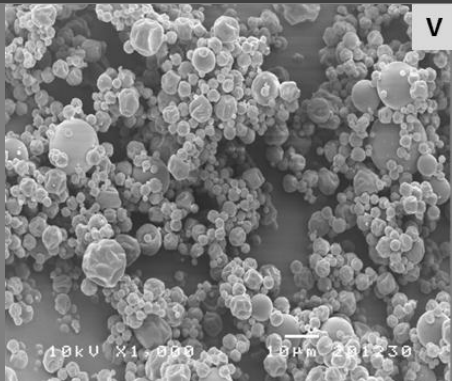
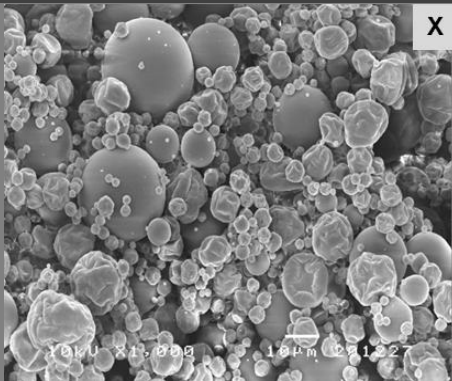
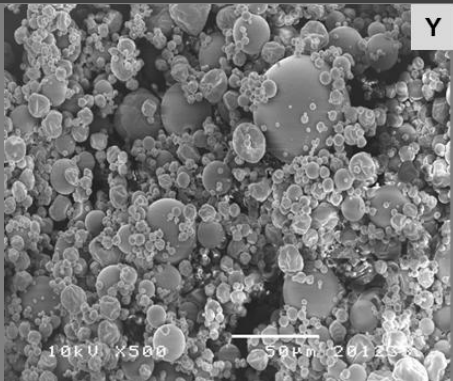
Amostras de inulinas	5%	10%	15%
Frutalose OFP ( $GP_m=4$ )	20,83 <sup>a</sup> $\pm$ 14,52	31,85 <sup>b</sup> $\pm$ 37,33	23,97 <sup>a</sup> $\pm$ 19,45
Inulina Padrão ( $GP_m=26$ )	3,418 <sup>a</sup> $\pm$ 1,790	4,682 <sup>b</sup> $\pm$ 2,525	4,788 <sup>b</sup> $\pm$ 2,910
Inulina Nativa Purificada OFP ( $GP_m=35$ )	4,224 <sup>a</sup> $\pm$ 2,104	6,168 <sup>b</sup> $\pm$ 4,071	9,406 <sup>c</sup> $\pm$ 6,607

Para cada amostra os valores seguidos da mesma letra minúscula, na linha, não são significativamente diferentes ( $p<0,05$ ).

**Quadro 9 - Imagens obtidas por SEM das amostras Frutalose OFP, Inulina Padrão e Inulina Nativa Purificada atomizadas a 190 °C e com diferentes teores de sólidos (5, 10 e 15%)**

Amostra	5%	10%	15%
Frutalose OFP (GP <sub>m</sub> =4)	 P	 Q	 R
Inulina Padrão (GP <sub>m</sub> =26)	 S	 T	 U



Amostra	5%	10%	15%
Inulina Nativa Purificada (GP <sub>m</sub> =35)			

Para os diferentes teores de sólidos ensaiados, as microcápsulas da amostra Frutalose OFP apresentam-se com diâmetros médios significativamente diferentes, sendo este efeito mais significativo entre concentrações próximas (5 e 10%; 10 e 15%) do que entre concentrações afastadas (5 e 15%). Assim, um aumento de 5 para 10% do teor de sólidos traduz-se num aumento significativo ( $p\text{-value}=0,000022$ ) do tamanho das partículas. Já o aumento da concentração de 10 para 15% conduz a uma diminuição significativa ( $p\text{-value}=0,000022$ ) do diâmetro médio das microcápsulas.

No caso da amostra Inulina Padrão, um aumento do teor de sólidos leva a um aumento significativo ( $p\text{-value}=0,000022$ ) da dimensão média das partículas formadas, entre 5 e 10% e 5 e 15%, não ocorrendo diferenças significativas entre 10 e 15%.

Já para a amostra de maior GP, Inulina Nativa Purificada, um aumento do teor de sólidos provoca um aumento significativo ( $p\text{-value}<0,0001$ ) do diâmetro médio das microcápsulas.

Através da análise da distribuição de frequências (quadro 10), pode verificar-se que a Frutalose OFP (12, 13 e 14), dependendo do teor de sólidos, apresenta maior percentagem de microcápsulas em classes de tamanhos diferentes. Para os teores de sólidos de 5 e 15%, há maior percentagem de microcápsulas com diâmetros compreendidos entre 10,1 – 20  $\mu\text{m}$ . Já para um teor de sólidos intermédio (10%) a maior percentagem de microcápsulas apresenta diâmetros entre 10,1 – 25  $\mu\text{m}$ . No entanto, independentemente do teor de sólidos da amostra, 80% das microcápsulas apresentam diâmetros inferiores a 35 – 40  $\mu\text{m}$ .

No caso da amostra Inulina Padrão (15,16 e 17) existe uma maior percentagem de microcápsulas com diâmetros compreendidos entre 1 – 5  $\mu\text{m}$ , com 80% das microcápsulas a apresentarem diâmetros inferiores a 5  $\mu\text{m}$ .

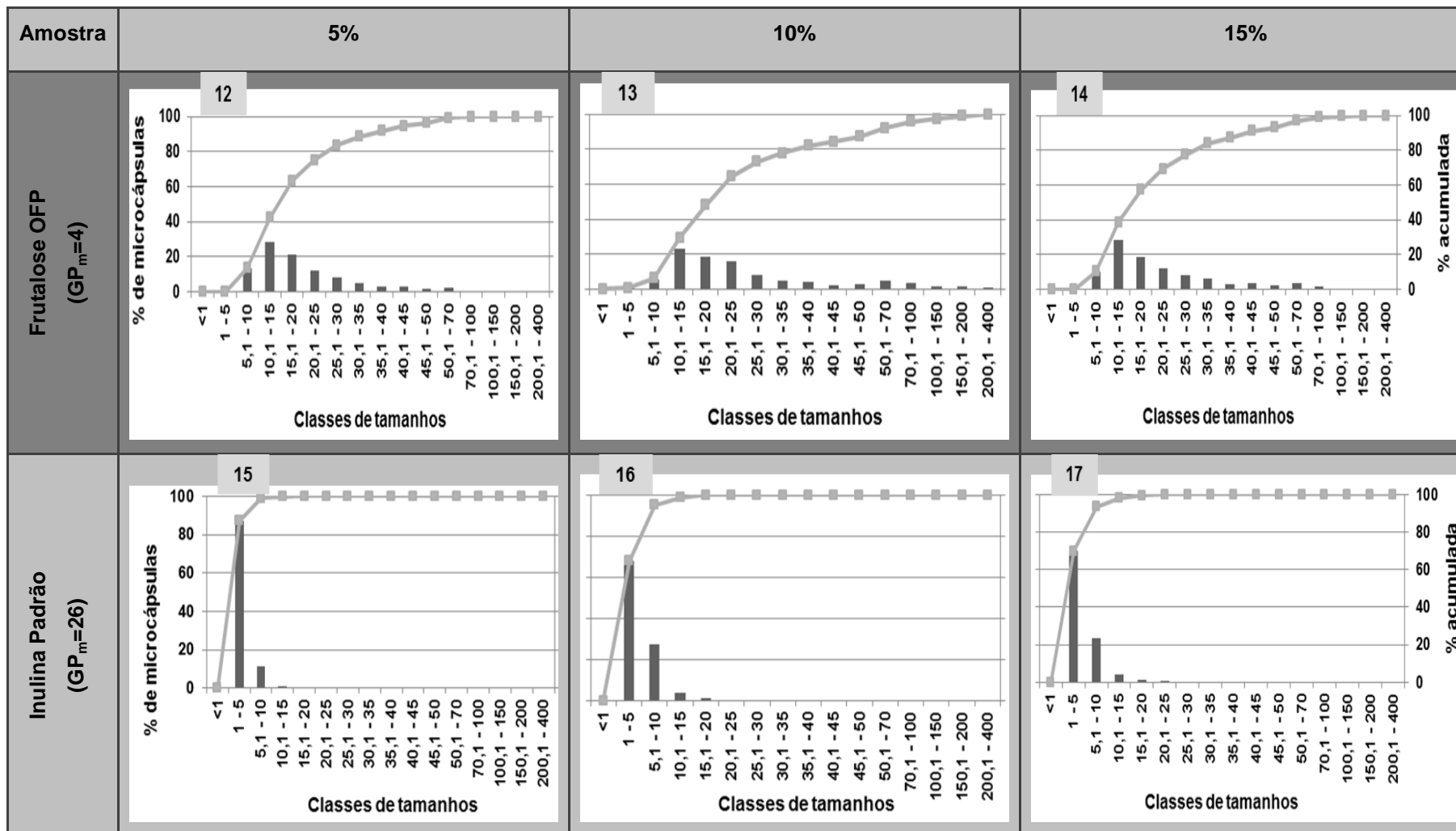
Já a amostra Inulina Nativa Purificada (18, 19 e 20), para 5 e 10% de teores de sólidos, possui maior percentagem de microcápsulas com diâmetros compreendidos entre 1 – 5  $\mu\text{m}$ . Contudo, 80% das microcápsulas têm diâmetros inferiores a 5  $\mu\text{m}$  para 5% e 10  $\mu\text{m}$  para 10%. Para 15% a amostra indica maior percentagem de microcápsulas com diâmetros entre 5,1 – 10  $\mu\text{m}$ , tendo 80% das microcápsulas diâmetros até 10  $\mu\text{m}$ .

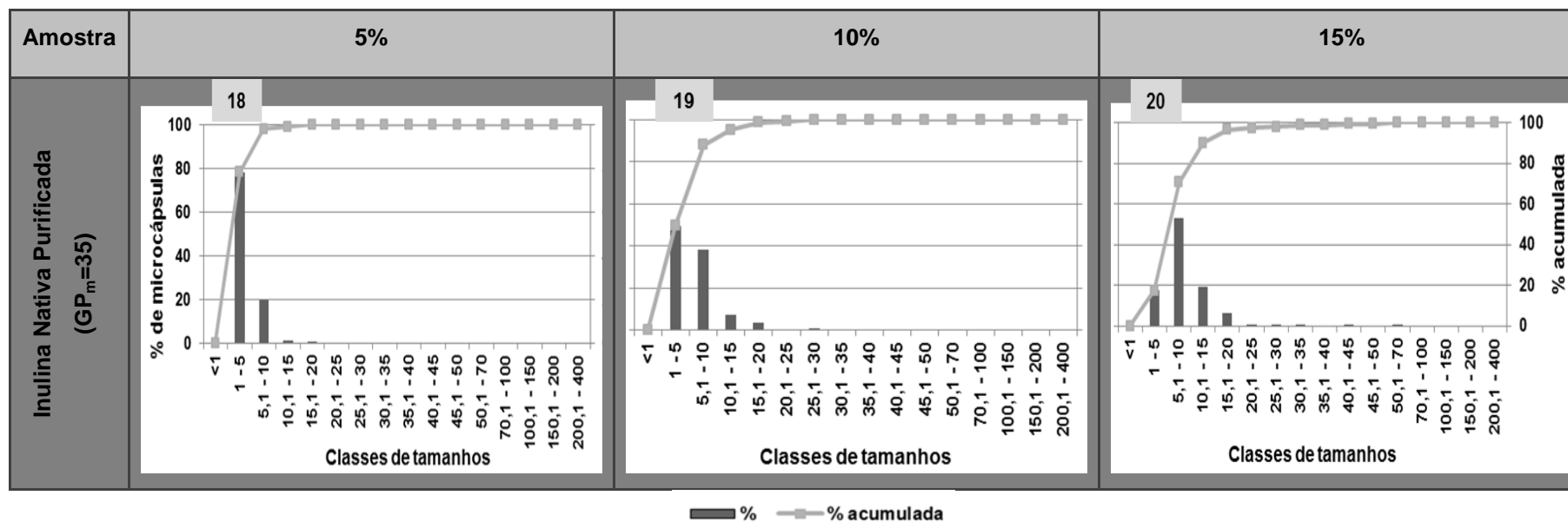
Analisando os resultados anteriormente descritos constata-se que há uma influência do teor de sólidos no diâmetro das microcápsulas e, o modo como este se traduz não é independente do GP. Na amostra de maior GP, Inulina Nativa Purificada ( $\text{GP}_m=35$ ), há uma tendência para o incremento da dimensão média das microcápsulas com o aumento da concentração. Para a amostra Inulina Padrão ( $\text{GP}_m=26$ ), o efeito do teor de sólidos também é evidente até aos 10%, estabilizando para 15%. Na amostra de menor GP, Frutalose OFP ( $\text{GP}_m=4$ ), o efeito do teor de sólidos é directamente proporcional entre 5 e 10% e, inversamente proporcional entre 10 e 15%. Esta inversão de efeito sugere que a maior

concentração de sólidos pode levar, a partir de um certo ponto, a uma formação mais rápida das cápsulas, não permitindo que estas aumentem tanto de volume como seria de esperar.

O diferente comportamento observado neste estudo para várias inulinas, face à variação da concentração de sólidos, também não se encontra descrito na bibliografia consultada. Estudos realizados com inulina por Barreiros (2009) indicam que o aumento do teor de sólidos se traduz num aumento do tamanho médio das partículas formadas, o mesmo sendo referido por Gharsallaoui *et al.* (2007) para a generalidade de materiais.

**Quadro 10 - Distribuição de frequências das amostras Frutalose OFP, Inulina Padrão e Inulina Nativa Purificada atomizadas a 190 °C e com diferentes teores de sólidos (5, 10 e 15%)**





### III – CONCLUSÕES

A caracterização por HPLC permitiu determinar diferentes valores de  $GP_m$  nas amostras em estudo: 4 para a Frutalose OFP (FOS); 10 para a Beneo GR (FOS e inulina); 26, 32 e 35 para as inulinas de maior GP (Inulina Padrão, Beneo HPX e Inulina Nativa Purificada, respectivamente).

Relativamente à morfologia das microcápsulas observadas por SEM, a amostra Frutalose OFP, constituída exclusivamente por FOS, originou microcápsulas ovóides e achatadas, de parede contínua e uniforme, independentemente da temperatura de atomização. Já as restantes amostras ( $GP \geq 10$ ) formaram microcápsulas esféricas de parede lisa e contínua, com presença de depressões e engelhamentos, principalmente quando a temperatura de atomização é mais baixa (120 °C).

O diâmetro médio das microcápsulas apresentou-se significativamente maior para a amostra de menor  $GP_m$  (FOS), independentemente da temperatura e do teor de sólidos, variando entre 21 – 32  $\mu m$ . Para as inulinas de  $GP_m \geq 10$ , quando atomizadas a 190 °C, não se observou variação significativa com o comprimento médio da cadeia de inulina, conduzindo a micropartículas de menores dimensões a variar entre 3 – 9  $\mu m$ .

Registou-se um efeito da temperatura de atomização nos diâmetros médios das microcápsulas, sendo este directamente proporcional para os FOS e inversamente proporcional nas inulinas de maior GP. Contudo, a partir de um  $GP_m$  muito elevado, na ordem dos 35, deixou de se verificar este efeito.

O teor de sólidos influenciou também o diâmetro das microcápsulas, havendo uma proporcionalidade directa para concentrações de sólidos entre 5 e 10%, independentemente do GP. Quando o teor de sólidos é superior a 10%, este efeito revelou-se directamente proporcional para um GP elevado ( $GP_m=35$ ), estabilizou para um GP intermédio ( $GP_m=26$ ) e apresentou-se inversamente proporcional para os FOS ( $GP_m=4$ ).

Com base nestes resultados, para aplicações onde se pretendam cápsulas de menores dimensões devem utilizar-se inulinas de maior  $GP_m$ , temperaturas de secagem mais elevadas e teores de sólidos mais baixos.

No sentido de complementar e permitir o melhor entendimento dos resultados alcançados, afigura-se interessante o estudo de outras propriedades físicas das diferentes fracções da inulina e sua influência nas características e comportamento deste glúcido prebiótico enquanto matriz de encapsulamento.

#### IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEREDO, H. (2005). Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. *Alimentos Nutrição*, **16** (1): 89-97.

BARREIROS, A. (2009). *Inulina como Agente Encapsulante de Compostos Bioativos*, Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar, Lisboa, Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, 101p.

BEIRÃO-DA-COSTA, M.; JANUÁRIO, I.; LEITÃO, A.; SIMÃO, F. (2005). Characterisation of Inulin from Chicory and Salsify Cultivated in Portugal. In: *2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering*, Rio de Janeiro, 14 – 18 August 2005.

BORROMEI, C.; CARERI, M.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; MANGIA, A.; MERUSI, C. (2009). Evaluation of Fructooligosaccharides and Inulins as Potentially Health Benefiting Food Ingredients by HPAEC-PED and MALDI-TOF MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, **2009**: 1-9.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial. *Journal of Food Engineering*, **104**: 467-483.

CARIOCA, J.; ALMEIDA, F.; ARORA, H.; SELVAM, P.; FIGUEIRÓ, S. (1988). Extração e Hidrólise de Inulina a partir da Alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.). *Ciência Agronómica. Fortaleza*, **19** (1): 61-66.

CARVALHO, J. (2009). *Encapsulamento de Óleo Essencial de Origanum virens L. em Matrízes de Gelatina e Gelatina/Sacarose*, Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar. Lisboa, Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, 76p.

CATALDO, L.; SILVA, C.; MENDES, M.; NOGUEIRA, R.; FREITAS, S. (2005). Extração de inulina a partir da raiz da chicória (*Chicorium intybus* L.) usando dióxido de carbono supercrítico. In: *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, 1-6.

CHAPLIN, M.; KENNEDY, J. (1986). *Carbohydrate analysis: a practical approach*. Oxford, IRL Press United, 228p.

CONRAD, E.; PALMER, J. (1976). Rapid analysis of Carbohydrates by High-pressure Liquid Chromatography, *Food Technology*, **30** (10): 84-92.

DOBRE, T.; STROESCU, M.; STOICA, A.; DRAGHICI, E.; ANTOHE, N. (2008). Inulin Extraction and Encapsulation. *Chemical Bulletin "Politehnica" University of Timisoara*, **53** (67): 215-217.

FLEMING, S.; GROOTWASSINK, J. (1979). Preparation of high-fructose syrup from tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **12** (1): 1-28. Citado por Januário, 1999.

FRANCK, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, **87** (2): 287-291.

FRANCK, A. (2006). Inulin. In: STEPHEN, A.; PHILLIPS, G.; WILLIAMS, P., *Food Polysaccharides and Their Applications*, Second Edition, Taylor & Francis Group, 752p.

GEANKOPLIS, C. (2007). *Transport Processes and Separation Process Principles*, 4ª Edição, New Jersey, Prentice Hall PTR, 1009p.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R.. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, **40**: 1107-1121.

GLIBOWSKI, P.; BUKOWSKA, A. (2011). The effect of pH, Temperature and Heating Time on Inulin Chemical Stability. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, **10** (2): 189-196.

GUIRAUD, J.; GALZY, P. (1981). Production de fructose par hydrolyse chimique de l'inulin. *Industries Alimentaires et Agricoles*, **98** (1/2): 45-52. Citado por Januário, 1999.

JANUÁRIO, M. (1999). *A Chicória: Valorização Industrial*, Dissertação de Doutoramento em Engenharia Agro-industrial, Lisboa, Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, 283p.

JANUÁRIO, M. (2011). Produção de Alimentos e de Ingredientes Funcionais: Inulina e Edulcorantes Naturais Obtidos da Chicória Industrial. In: PEREIRA, L.; VARENNES, A.; OLIVEIRA, C.; FERREIRA-DIAS, S., *Engenharia dos Biosistemas – Cem temas de Investigação no Centenário do Isa*, Lisboa, Edições Colibri – CEER, 341-344.

KELLY, G. (2008). Inulin-Type Prebiotics – A Review: Part 1. *Alternative Medicine Review*, **13** (4): 315-329.

KELLY, G. (2009). Inulin-Type Prebiotics – A Review (Part 2). *Alternative Medicine Review*, **14** (1): 36-55.

KING, C. (1984). Transport processes effecting food quality in spray drying: review paper. In: Mc KENNA, B. *Engineering and Food Vol. 2 - Processing Applications*, Dublin, Ireland, Elsevier Applied Science, 559-574.



LAURENZO, K.; NAVIA, J.; NEIDITCH, D. (1999). Preparation of Inulin Products. *United States Patent*, **5.968.365**.

LEITE, J.; PARK, K.; RAMALHO, J.; FURLAN, D. (2004). Caracterização Reológica das Diferentes Fases de Extracto de Inulina de Raízes de Chicória, Obtidas Por Abaixamento de Temperatura. *Engenharia Agrícola, Jaboticabal*, **24** (1): 202-210.

MADRIGAL, L.; SANGRONIS, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, **57** (4): 387-396.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, **1**: 1806-1815.

OLIVEIRA, R.; PARK, K.; CHIORATO, M.; PARK, K.; NOGUEIRA, R. (2004). Otimização de Extração de Inulina de Raízes de Chicória. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, **6** (2): 131-139.

PARK, K.; OLIVEIRA, R.; BROD, F. (2007). Drying Operational Parameters Influence on Chicory Roots Drying and Inulin Extraction, *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Chemical Engineers, Part C*, **85** (C3): 184-192.

PARRA-HUERTAS, R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín*, **63** (2): 5669-5684.

PERSHAK, F.; WOLFSLEHNER, L. (1990). Vorläufige versuche zur herstellung eines stark fructosehaltigen sirups aus zichorienwurzeln. *Zurckerindustrie*, **115** (6): 466-470. Citado por Januário, 1999.

POLLOCK, C.; HALL, M.; ROBERTS, D. (1979). Structural analysis of fructose polymers by gas-liquid chromatography and gel filtration. *Journal of Chromatography*, **171**: 411-415. Citado por Januário, 1999.

ROBERFROID, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, **34**: 105-110.

ROBERFROID, M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, **137** (3): 830-837.

ROQUETE, M.; DUFLOT, P.; DELOBEAU, D. (1989). Procédé de préparation de sirops de fructose à partir de matières premières végétales contenant de l'inuline. *Brevet d'Invention*, FR 2 618 191. 26 p. Citado por Januário, 1999.

SIMÃO, F. (2004). *Caracterização Físico-Química da Inulina da raiz da Chicória e da Raiz da Cherovia*, Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar, Lisboa, Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa, 53p.

SIMÃO, F.; JANUÁRIO, M.; LEITÃO, A.; BEIRÃO-DA-COSTA M. (2005). Extracção, purificação e caracterização da inulina das raízes de chicória. *In: 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu, 13-16 Abril 2005*.

SIMS, I.; SMOUTER, H.; POLLOCK, C.; SIMPSON, R. (1991). The separation of complex mixtures of fructo-oligosaccharides from plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **29**: 257-267. Citado por Januário, 1999.

TONELI, J.; MURR, F.; MARTINELLI, P.; FABBRO, I.; PARK, K. (2007). Optimization of a physical concentration process for inulin. *Journal of Food Engineering*, **80**: 832-838.

TONELI, J.; PARK, K.; MURR, F.; NEGREIROS, A. (2008a). Efeito da umidade sobre a microestrutura da inulina em pó. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, **28** (1): 122-131.

TONELI, J.; PARK, K.; RAMALHO, J.; MURR, F.; FABBRO, I. (2008b). Rheological Characterization of Chicory Root (*Cichorium Intybus* L.) Inulin Solution. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **25** (3): 461-471.

VOS, P.; FASS, M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food componentes. *International Dairy Journal*, **20**: 292-302.

WACK, M.; BLASCHEK, W. (2006). Determination of the structure and degree of polymerisation of fructans from *Echinacea purpurea* roots. *Carbohydrate Research*, **341**: 1147-1153.

#### **Sites consultados:**

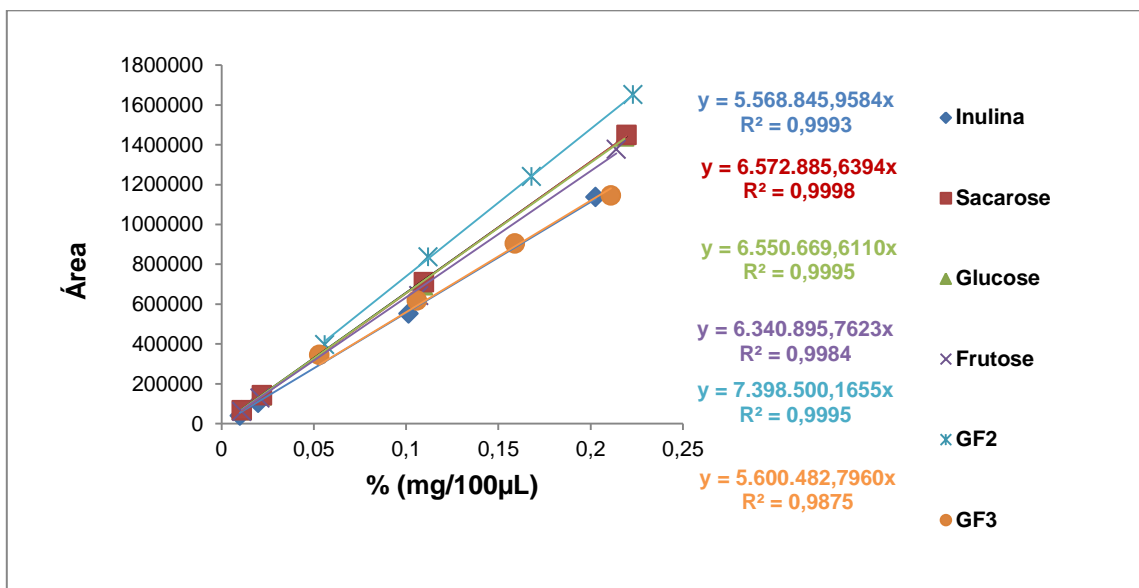
[www.orafti.com](http://www.orafti.com). Consultado em 06/06/2012.

[www.sensus.nl](http://www.sensus.nl). Consultado em 06/06/2012.

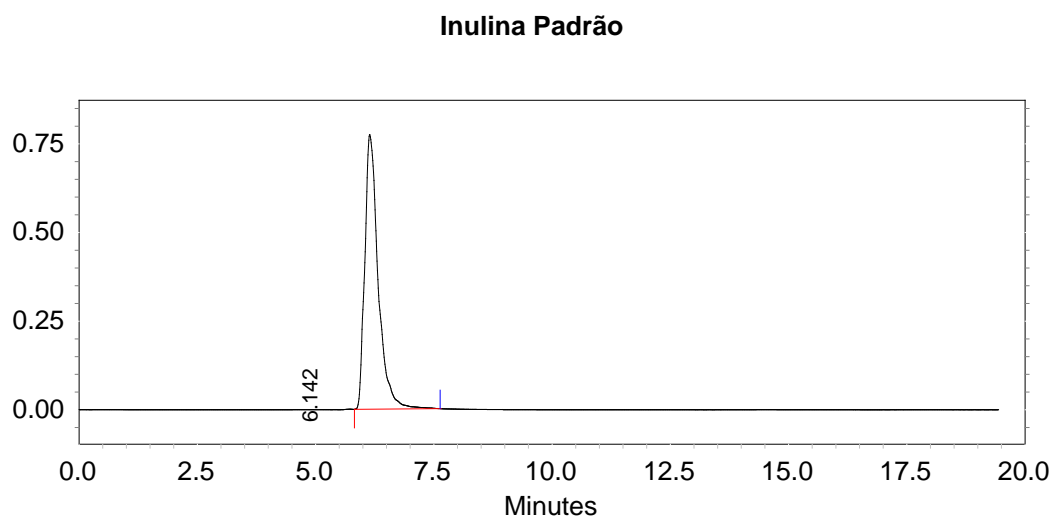
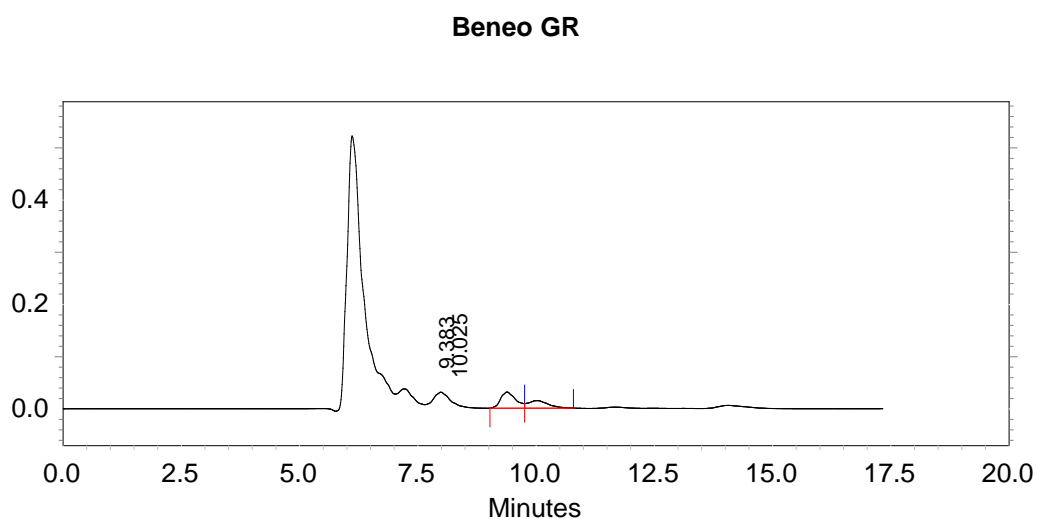
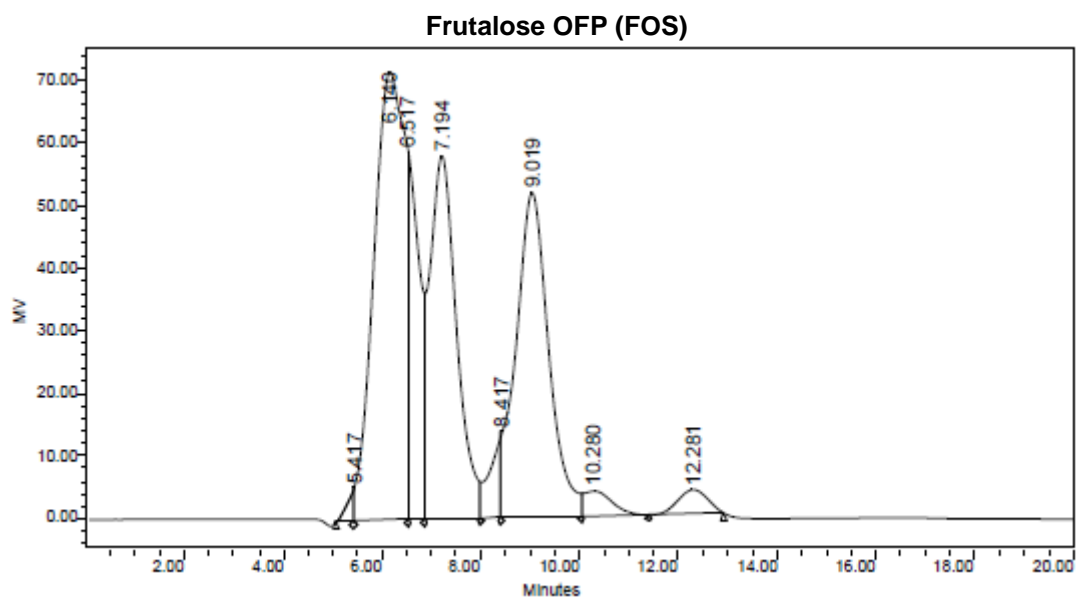
[http://www.ascorchimici.it/eng/coated\\_info\\_tec.asp](http://www.ascorchimici.it/eng/coated_info_tec.asp). Consultado em 06/06/2012.

## V – ANEXOS

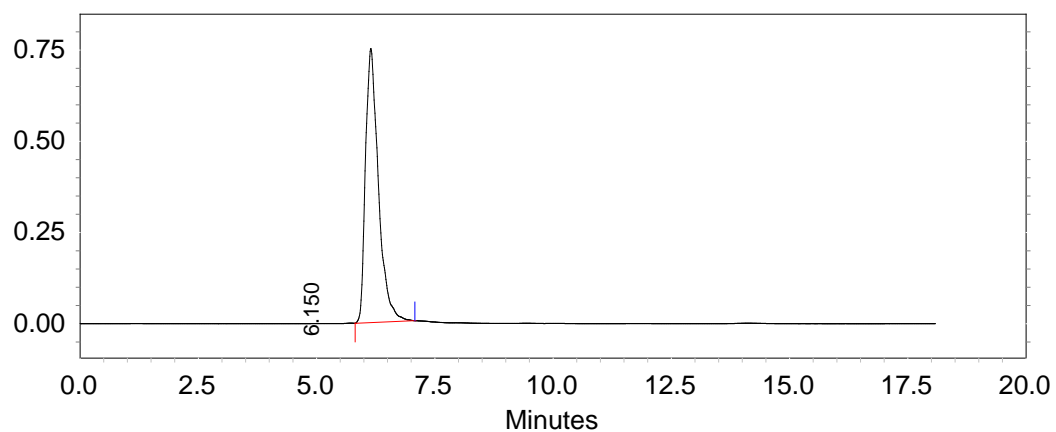
### Anexo 1 – Curvas de calibração para o doseamento dos glúcidos por HPLC



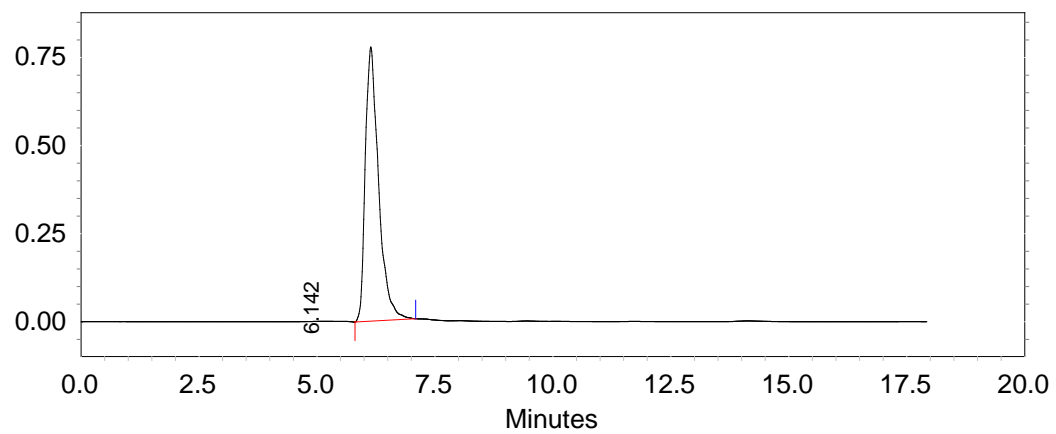
**Anexo 2 – Registos cromatográficos das amostras analisadas por HPLC (coluna Sugar-Pak I; fase móvel: água ultra pura com EDTA-Ca com fluxo 0,5 mL/min)**



### Beneo HPX



### Inulina Nativa Purificada



**Anexo 3 – Resultados da caracterização glucídica das amostras por HPLC, usados na determinação do GP<sub>m</sub> da inulina**

Frutalose OFP	GP					[FOS] <sub>Total</sub> com GP a variar entre 2 e 7	GP <sub>m</sub> <sup>*</sup>
	6-7	5	4	3	2		
[FOS] mg/100µL	0,0091	0,5565	0,1647	0,2985	0,3764	1,4052	3,66
[FOS] mg/100µL	0,0113	0,5661	0,1543	0,2981	0,3756	1,4053	3,68
[FOS] mg/100µL	0,0091	0,5740	0,1577	0,3054	0,3932	1,4395	3,66
Média	0,0098	0,5655	0,1589	0,3007	0,3817	1,4167	3,67
Desvio Padrão	0,00125	0,00878	0,00532	0,00412	0,00997	0,01975	0,01

$$GP_m^* = \frac{6,5[FOS]_{GP=6-7} + 5[FOS]_{GP=5} + 4[FOS]_{GP=4} + 3[FOS]_{GP=3} + 2[FOS]_{GP=2}}{[FOS]_{Total}}$$

Amostra	Açúcares livres no extracto antes da Hidrólise (mg/100µL)			Açúcares totais no hidrolisado (mg/100µL)			Monossacáridos constituintes da inulina (mg/100µL)		GP <sub>m</sub> (Fi/Gi)+1	Média
	Gl	Fl	Sah	Sdh	Gt	Ft	Gi	Fi		
Beneo GR			0,01	0,03	0,14	1,27	0,14	1,27	10,16	10,12±0,10
			0,01	0,03	0,14	1,26	0,14	1,26	10,00	
			0,01	0,03	0,14	1,26	0,14	1,26	10,19	
Inulina Padrão				0,03	0,05	1,34	0,05	1,34	26,17	26,44±0,52
				0,03	0,05	1,34	0,05	1,34	27,04	
				0,03	0,05	1,34	0,05	1,34	26,10	
Beneo HPX				0,02	0,04	1,30	0,04	1,30	30,83	31,55±0,63
				0,02	0,04	1,29	0,04	1,29	31,97	
				0,02	0,04	1,29	0,04	1,29	31,85	
Inulina Nativa Purificada				0,04	0,04	1,40	0,04	1,40	35,45	34,97±0,41
				0,04	0,04	1,40	0,04	1,40	34,69	
				0,04	0,04	1,40	0,04	1,40	34,78	

Nota: Calculou-se o GP<sub>m</sub> considerando apenas os açúcares totais e livres (G e F) por serem muito reduzidos os teores da sacarose existente antes e após hidrólise.